



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES
METABÓLICAS INDUCIDAS POR LA DIETA
MEDIANTE TÉCNICAS DE PROTEÓMICA.
EFECTO DEL CONSUMO DE ÁCIDOS GRASOS
OMEGA-3 DE ORIGEN MARINO**

Fdo.

LUCÍA MÉNDEZ LÓPEZ

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE VETERINARIA

LUGO

2015

Dña. María Isabel Medina Méndez, Profesora de Investigación en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC) y el Dr. Manuel Pazos Palmeiro, Doctor Contratado en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC) como Directores de la Tesis de Doctorado titulada: **“Estudio de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta mediante técnicas de proteómica. Efecto Del Consumo De Ácidos Grasos Omega-3 De Origen Marino”**, presentada por Dña. Lucía Méndez López, alumna del Programa de Doctorado de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela

Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Vigo, a 29 de septiembre de 2015

Fdo. Dra. María Isabel Medina Méndez

Fdo. Dr. Manuel Pazos Palmeiro

Dr. José Antonio Villamarín Cid, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela como Tutor de la Tesis de Doctorado titulada: **“Estudio de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta mediante técnicas de proteómica. Efecto Del Consumo De Ácidos Grasos Omega-3 De Origen Marino”**, presentada por Dña. Lucía Méndez López, alumna del Programa de Doctorado de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela

Autoriza la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Tutor de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Vigo, a 29 de septiembre de 2015

Fdo. Dr. José Antonio Villamarín Cid



Dña. María Isabel Medina Méndez, Profesora de Investigación en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC) y el Dr. Manuel Pazos Palmeiro, Doctor Contratado en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC) como Directores de la tesis titulada: **“Estudio de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta mediante técnicas de proteómica. Efecto Del Consumo De Ácidos Grasos Omega-3 De Origen Marino”**.

Por la presente **DECLARAN:**

Que la tesis presentada por Doña Lucía Méndez López es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que la doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra tesis de Doctorado, que firmamos bajo nuestra responsabilidad.

Vigo, a 29 de septiembre de 2015.

Fdo. Dra. María Isabel Medina Méndez

Fdo. Dr. Manuel Pazos Palmeiro

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar en estas líneas mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Isabel Medina, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, porque sin su guía, su apoyo y sus consejos habría sido imposible llegar hasta aquí. Su capacidad de trabajo, su intuición y su generosidad han sido una motivación constante.

A mi director de tesis, el Dr. Manuel Pazos, por su infinita paciencia, su esfuerzo y su apoyo que han hecho que esta tesis doctoral sea posible. A ambos les agradezco enormemente la confianza depositada en mí y solo espero responder justamente a la misma.

Asimismo, quisiera agradecer a mi tutor, el Dr. Antonio Villamarín, del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Lugo, su ayuda incondicional, su esfuerzo diario y sus consejos. Hago extensivo el agradecimiento al resto de profesores del departamento, en especial al Dr. Ramiro Barcia y a la Dra. Izaskun Ibarguren, que no solo son excelentes profesionales, sino que además son bellísimas personas. Muchas gracias por vuestras enseñanzas y por vuestro cariño.

Al todo el departamento de Química de Productos Marinos del IIM, que ha sido mi familia durante estos años. Al Dr. José Manuel Gallardo, por su apoyo, su interés y sus sabios consejos, y al Dr. Santiago Aubourg, por su generosidad y ayuda desinteresada siempre que la he necesitado. Al resto de mis compañeros del laboratorio de QPM, en especial, mi más infinito agradecimiento a Lore, ya que no solo ha sido vital para la realización de esta tesis, sino que ha sido quien más me ha aguantado, comprendido, aconsejado y animado, y también a Mónica, que siempre tiene una palabra de ánimo y que siempre me ha apoyado. También quisiera dar las gracias a Cruz, a Chus, a Marcos, a Pili, a Montse, a Gabriel y a Silvia, y resto de compañeros con los que he coincidido durante estos años, en especial a Eduardo, Salomé, Paula, Carlos y Rodri. Entre todos habéis hecho que conseguido que sea un placer venir al instituto y que me siempre me haya sentido como en casa.

A todo el grupo de Bioquímica de Alimentos del IIM, a sus directores la Dra. Carmen G. Sotelo y el Dr. Ricardo Pérez, muchas gracias por vuestro interés y por permitirme utilizar el transiluminador para realizar mis experimentos siempre que lo he necesitado. Muchas gracias también a Ana, María, Marta, Patri, Amaya, Carla, Ledi, Anxela y Susana. Todas son también una parte muy importante de esta tesis.

Quisiera hacer extensivo mi agradecimiento a todo el personal del IIM, por su simpatía y su buena disposición siempre que he necesitado algo (que han sido muchas veces). En especial, quiero mencionar a Manuel, a Bárbara y a Delia, por esas conversaciones a horas intempestivas y por animarme siempre que lo necesitaba.

Quisiera agradecer de manera especial al Dr. Juan Pablo Albar, que me permitió realizar una estancia tan maravillosa en su laboratorio de Proteómica funcional del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) de Madrid. Su marcha prematura es una pérdida irreparable a nivel científico, pero sobre todo a nivel humano. A todos los miembros de ese equipo fantástico que reunió Juan Pablo, que no sólo me enseñasteis a entender la proteómica sino que me regalasteis unos de los meses más felices de mi vida. En especial, le agradezco a Sergio, a Silvia, a Marisol y a Antonio su paciencia para enseñarme cómo funcionaba eso de la proteómica cuantitativa.

Quisiera agradecer también al Dr. Josep Lluís Torres y su equipo, y a la Dra. M Rosa Nogués y su equipo, por su trato amable y familiar, y su generosidad y empeño en ayudarme siempre que he ido a su laboratorio. Me habéis enseñado mucho tanto a nivel humano como científico.

A mi familia, sobre todo a mis padres y mi hermana que siempre me han apoyado y me han dado su amor incondicional. A mis primos, abuelos, a mi cuñado y a mis tíos, en especial a Mari, a la que echo de menos cada día y que espero que se sienta orgullosa mí. Muchas gracias a todos por quererme tanto.

A todos mis amigos, en especial a Aida, porque siempre ha sido como una hermana para mí, y a Jara, que jamás imaginé tener la suerte de conocer, a la que quiero y respeto profundamente.

Finalmente, quisiera agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación por concederme una beca predoctoral FPI para la realización de esta tesis doctoral.

Todos vosotros me habéis ayudado a crecer como persona y como científica y solo espero haberme ganado un pedacito en vuestro corazón, porque todos y cada uno de vosotros ocupáis uno en el mío. Ojalá yo haya sido capaz de devolveros solo un poco de todo lo que vosotros me habéis regalado a mí.

MUCHÍSIMAS GRACIAS

El trabajo de investigación que se presenta en esta memoria se ha desarrollado en el grupo de Química de Productos Marinos del Instituto de Investigaciones Marinas (IIM) de Vigo, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y ha sido financiado por los siguientes proyectos:

“Mecanismos de acción de los ácidos grasos poliinsaturados de origen marino en el síndrome metabólico y sinergismo con polifenoles e iminociclitolos” (AGL2009-12374-C03-01, -02,-03)

“Función de los mediadores lipídicos marinos omega-3 y la fagomina en la presencia de alteraciones metabólicas derivadas de dietas hipercalóricas” (AGL2013-49079-C2-1,2-R)

Para la realización de la presente tesis, Dña. Lucía Méndez López ha sido beneficiaria de la ayuda predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Los resultados obtenidos de este trabajo han dado lugar hasta la fecha de su presentación a tres publicaciones científicas aceptadas y una enviada:

1. Méndez L, Pazos M, Gallardo JM, Torres JL, Pérez-Jiménez J, Nogués MR, Romeu M, Medina I *Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine omega-3 PUFAs*. Free Radical Biology and Medicine. 2013;55:8-20. Impact factor (2013): 5.71

2. Méndez L, Pazos M, Giralt M, Nogués MR, Pérez-Jiménez J, Torres JL, Gallardo JM, Medina I. *Targets of protein carbonylation in spontaneously hypertensive obese Koletsky rats and healthy Wistar counterparts: A potential role on metabolic disorders*. The Journal of Proteomics. 2014;106:246-59. Impact factor (2014): 3.888

3. Méndez L, Pazos M, Molinar-Toribio E, Sánchez-Martos V, Gallardo JM, Nogués MR, Torres JL, Medina I. *Protein carbonylation associated to high-fat, high-sucrose diet and its metabolic effects*. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2014, 25:1243-1253. Impact factor (2014): 3.794

4. **Méndez L**, Pazos M, Ciordia S, Fernández MS, Juárez S, Ramos A, Gallardo JM, Medina I. *Changes in liver proteins of rats fed both low and high-fat and sucrose diets induced by fish omega-3 PUFAs and their combination with grape polyphenols according to quantitative proteomics*. Enviado.

Adicionalmente, la doctoranda ha colaborado en las siguientes publicaciones:

• **Méndez L**, Hellman U, Ibarguren I, Villamarín JA. *Filamin isoforms in molluscan smooth muscle*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2012;1824:1334-41.

• Pazos M, **Méndez L**, Gallardo JM, Aubourg SP. *Selective-Targeted Effect of High-Pressure Processing on Proteins Related to Quality: a Proteomics Evidence in Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*)*. Food Bioprocess Technology. 2014;7:2342-53.

• Lluís L, Taltavull N, Muñoz-Cortés M, Sánchez-Martos V, Romeu M, Giralt M, Molinar-Toribio E, Torres JL, Pérez-Jiménez J, Pazos M, **Méndez L**, Gallardo JM, Medina I, Nogués MR. *Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats*. Lipids in Health and Disease. 2013;12:140.

• Molinar-Toribio E, Pérez-Jiménez J, Ramos-Romero S, Lluís L, Sánchez-Martos V, Taltavull N, Romeu M, Pazos M, **Méndez L**, Miranda A, Cascante M, Medina I, Torres JL. *Cardiovascular Disease-Related Parameters and Oxidative Stress in SHROB Rats, a Model for Metabolic Syndrome*. PLoS ONE. 2014;9:e104637.

• Pazos M, **Méndez L**, Vázquez M, Aubourg SP. *Proteomics analysis in frozen horse mackerel previously high-pressure processed*. Food Chem. 2015;185:495-502.

• Pazos M, **Méndez L**, Fidalgo L, Vázquez M, Antonio Torres J, Aubourg S, Saraiva J. *Effect of High-Pressure Processing of Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) on Biochemical Changes During Commercial Frozen Storage*. Food Bioprocess Technol. 2015;8:2159-70.

“Estudio de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta mediante técnicas de proteómica.

Efecto del consumo de ácidos grasos omega-3 de origen marino”

RESUMEN

Alteraciones metabólicas tales como obesidad, resistencia a insulina, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión se han convertido en importantes problemas de salud en los países desarrollados. Entre las estrategias nutricionales propuestas para minimizar su incidencia, se encuentra la suplementación de la dieta con ácidos grasos omega-3 de origen marino, especialmente los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). Sin embargo, muchos aspectos de sus mecanismos específicos de acción o de sus dosis óptimas permanecen desconocidos. Especial controversia ha suscitado su influencia sobre el estrés oxidativo *in vivo*, factor clave en la aparición y progresión de estos trastornos. Por ello, la presente tesis doctoral estudió el efecto de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta y del consumo de EPA y DHA sobre la homeostasis redox, principalmente mediante la evaluación del nivel de carbonilación de las proteínas celulares. Aplicando metodologías de la proteómica redox, se identificaron proteínas y rutas metabólicas diana del efecto perjudicial o beneficioso de la dieta, y se reveló un efecto protector de los omega-3 marinos frente al daño proteico oxidativo, que fue altamente dependiente de las proporciones relativas de EPA y DHA. Adicionalmente, se evaluó el efecto de estos omega-3 sobre la regulación de los niveles de las proteínas celulares, así como la posible acción sinérgica resultante de su combinación con polifenoles de uva. El empleo de herramientas de la proteómica cuantitativa permitió la identificación de nuevas proteínas diana relacionadas con la prevención de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta objeto de estudio. En conjunto, los resultados obtenidos resaltan la importancia del proteoma celular en la aparición y progresión de numerosas alteraciones metabólicas y abre el camino para la identificación de posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de dichos trastornos mediante estrategias nutricionales basadas en el empleo de omega-3 de origen marino y de otros compuestos bioactivos afines.

Palabras clave:

alteraciones metabólicas, ácidos grasos poliinsaturados omega-3, compuestos bioactivos, proteómica redox, proteómica cuantitativa

RESUMO

Alteracións metabólicas tales como obesidade, resistencia a insulina, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión constitúen importantes problemas de saúde nos países desenvolvidos. Entre as estratexias nutricionais propostas para minimizar a súa incidencia atópase a suplementación da dieta con ácidos graxos omega-3 de orixe mariña, especialmente os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA). Con todo, moitos aspectos dos seus mecanismos específicos de acción ou das súas doses óptimas permanecen descoñecidos. Especial controversia suscita a súa influencia sobre o estrés oxidativo *in vivo*, un factor chave na aparición e progresión destes trastornos. Por todo iso, a presente tese de doutoramento estudou o efecto das alteracións metabólicas inducidas pola dieta e do consumo de EPA e DHA sobre a homeostase redox, principalmente mediante a avaliación do nivel de carbonilación das proteínas celulares. Aplicando metodoloxías da proteómica redox, identificáronse proteínas e rutas metabólicas diana do efecto prexudicial ou beneficioso da dieta, e revelóuse un efecto protector dos omega-3 mariños fronte ao dano proteico oxidativo, que foi altamente dependente das proporcións relativas de EPA e DHA. Adicionalmente, tamén se avaliou o efecto destes omega-3 sobre a regulación dos niveis das proteínas celulares, así como a posible acción sinérxica resultante da súa combinación con polifenoles de uva. O emprego de ferramentas da proteómica cuantitativa permitiu a identificación de novas proteínas diana, que se relacionaron coa prevención das alteracións metabólicas inducidas pola dieta. En conxunto, os resultados obtidos resaltan a importancia do proteoma celular na aparición e progresión de numerosas alteracións metabólicas e abre o camiño para

a identificación de posibles dianas terapéuticas para o tratamento dos devanditos trastornos mediante estratexias nutricionáis baseadas no emprego de omega-3 de orixen mariño e doutros compostos bioactivos semellantes.

PALABRAS CHAVE:

alteracións metabólicas, ácidos graxos poliinsaturados omega-3, compostos bioactivos, proteómica redox, proteómica cuantitativa

SUMMARY

Metabolic disorders such as obesity, insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and hypertension have become major health problems in developed countries. The supplementation of diet with omega-3 from marine origin, especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) is found among the nutritional strategies used to minimize the increasing prevalence of these disorders. However, many aspects of their specific action mechanisms and their optimal doses remain unknown. Particularly controversial is the influence of omega-3 fatty acids on oxidative stress *in vivo*, a key factor in the onset and progression of these disorders. Therefore, the present research studied the effect of the metabolic disorders induced by diet and the consumption of EPA and DHA on the redox homeostasis, mainly by measuring the level of carbonylation of cellular proteins. By applying methodologies of redox proteomics, different proteins and metabolic pathways were identified as targets of the harmful or beneficial effect exerted by diet. EPA and DHA supplementations showed a protective effect from protein oxidative damage, which was highly dependent on the relative proportions of EPA and DHA in diet. Additionally, the effect of marine omega-3 fatty acids on the regulation of the levels of cellular proteins and the possible synergistic action resulting from their combination with grape polyphenols were also evaluated. Quantitative proteomics tools allowed the identification of new protein targets of EPA and DHA consumption related to the prevention of diet-induced metabolic abnormalities. Overall, the results highlight the importance of the cellular proteome in the onset and progression of metabolic disorders. The findings constitute a good starting point for identifying therapeutic targets for the treatment of disorders through nutritional strategies based on the use of omega-3 fish and other related bioactive compounds.

KEYWORDS:

metabolic disorders, omega-3 polyunsaturated fatty acids, bioactive compounds, redox proteomics, quantitative proteomics

ÍNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	1
I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	15
1. Dieta y salud	17
1.1. Aspectos evolutivos de la dieta humana	17
1.2. Consecuencias de la evolución sufrida por la dieta humana	20
1.3. Alimentación y estrés oxidativo	21
1.3.1. Definición de estrés oxidativo	21
1.3.2. Prooxidantes: Radicales libres y especies reactivas	21
1.3.3. Antioxidantes	23
1.3.4. Importancia de la homeostasis redox	24
1.3.5. Enfermedades metabólicas inducidas por la dieta y el estrés oxidativo	25
2. Alimentación funcional, ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga de origen marino y otros compuestos bioactivos	29
2.1. Alimentos funcionales y nutraceuticos	29
2.2. Omega-3 PUFAs de origen marino	31
2.2.1. Clasificación de los PUFAs de la dieta	31
2.2.2. Síntesis <i>de novo</i> de los PUFAs en mamíferos	32
2.2.2.1. Rendimiento de la síntesis <i>de novo</i> de EPA y DHA	34
2.2.3. Principales funciones biológicas de los omega-3 PUFAs	35
2.2.3.1. Componentes de las membranas celulares	35
2.2.3.2. Precursores de los eicosanoides y docosanoides	36
2.2.3.3. Reguladores de la expresión génica	38
2.2.4. Omega-3 PUFAs y estrés oxidativo	40
2.2.5. Efectos saludables e ingestas recomendadas de los omega-3 PUFAs	41
2.3. Polifenoles	42
2.3.1. Polifenoles en la prevención de enfermedades	44
3. Roedores como modelos animales para el estudio de alteraciones metabólicas inducidas por la dieta	45

3.1. Roedores como modelos animales para el estudio de alteraciones metabólicas inducidas por la dieta	45
3.2. Modelos genéticos	46
3.2.1. Ratos Koletsy: genéticamente obesas espontáneamente hipertensas (SHROB)	48
3.3. Modelos inducidos por dietas	49
3.3.1. Características de las dietas altas en grasa	50
3.3.2. Características de las dietas altas en carbohidratos refinados	51
3.3.3. Características de las dietas altas en grasa y carbohidratos refinados	51
4. Metodologías proteómicas para la investigación nutricional	53
4.1. Ómicas para la investigación nutricional	53
4.1.1. Proteómica y nutriproteómica	53
4.2. Proteómica redox	54
4.2.1. Carbonilación proteica	56
4.2.2. Consecuencias biológicas de la carbonilación de proteínas	61
4.2.2.1. Papel de la carbonilación proteica en la señalización celular	62
4.2.3. Metodologías para el análisis de la carbonilación proteica	63
4.2.3.1. Determinaciones basadas en gel	64
4.2.3.2. Determinaciones libres de gel	66
4.3. Proteómica cuantitativa	69
4.3.1. Proteómica cuantitativa basada en gel	69
4.3.2. Proteómica cuantitativa basada en espectrometría de masas	72
4.3.2.1. Metodologías cuantitativas basadas en el marcaje con isótopos estables	74
4.3.2.1.1. Marcaje metabólico	74
4.3.2.1.2. Marcaje químico	75
4.3.2.1.3. Marcaje enzimático	77
4.3.2.2. Metodologías Label-free	77
4.4. Aplicación de la proteómica redox y la proteómica cuantitativa a la investigación nutricional	78

4.4.1. Estado del arte de la proteómica y la proteómica nutricional	78
4.4.2. Estado del arte de la proteómica nutricional cuantitativa y redox	79
4.4.2.1. Proteómica y carbonilación proteica aplicada a la investigación nutricional	81
4.4.2.2. Proteómica cuantitativa aplicada a la investigación nutricional	84
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	91
IV. RESULTADOS	97
Capítulo 1. Publicación: <i>Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine omega-3 PUFAs</i> (http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.004)	101
Capítulo 2. Publicación: <i>Targets of protein carbonylation in spontaneously hypertensive obese Koletsky rats and healthy Wistar counterparts: A potential role on metabolic disorders</i> (http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.036)	115
Capítulo 3. Publicación: <i>Protein carbonylation associated to high-fat, high-sucrose diet and its metabolic effects</i> (http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.014)	131
Capítulo 4. <i>Changes in liver proteins of rats fed both low and high-fat and sucrose diets induced by fish omega-3 PUFAs and their combination with grape polyphenols according to quantitative proteomics</i>	145
4.1. Abstract	147
4.2. Introduction	148
4.3. Materials and methods	150
4.3.1. Animals and experimental design	150
4.3.2. Biochemical measurements	152
4.3.3. Cytosolic liver protein isolation and pool creation	152
4.4. Proteomics approaches to analyse the effect of FO and PP on liver cytosolic protein regulation	153
4.4.1. iTRAQ approach	153
4.4.1.1. Protein digestion of pooled samples	153
4.4.1.2. Peptide labelling	153
4.4.1.3. Nano-LC and MS Analysis	154
4.4.1.4. Database searches and statistics	155

4.4.2. 2D-DIGE approach	155
4.4.2.1. DIGE experimental design	155
4.4.2.2. 2D-DIGE separation	156
4.4.2.3. Image acquisition and analysis	157
4.4.2.4. In-gel protein automatic digestion and protein identification	159
4.4.5. Gene ontology (GO) and network analysis	159
4.5. Results	159
4.5.1. Outcomes under isocaloric LFLS diets	159
4.5.1.1. Biochemical parameter	159
4.5.1.2. Protein identification and quantification in cytosolic protein fraction of liver by iTRAQ analysis	161
4.5.1.3. Up and Down Regulation of liver proteins by iTRAQ analysis	162
4.5.1.4. Functional information of differentially regulated proteins: gene ontologies and network analysis	168
4.5.2. Outcomes under isocaloric HFHS diets	169
4.5.2.1. Biochemical parameters	169
4.5.2.2. Protein identification and quantification in cytosolic fraction of liver by iTRAQ analysis	170
4.5.2.3. Up and Down Regulation of liver proteins by iTRAQ analysis	171
4.5.3. Analysis of 2D-DIGE images of rat liver of HFHS diet	173
4.5.4. Functional information of differentially regulated proteins in HFHS-fed rats: gene ontologies and network analysis	179
4.6. Discussion	181
4.6.1. Liver protein regulation in LFLS diets	182
4.6.2. Liver protein regulation in HFHS diets	184
4.7. Conclusions	191
V. DISCUSIÓN INTEGRADORA	195
VI. CONCLUSIONES	211
VII. BIBLIOGRAFÍA	215
ANEXO 1. Material suplementario del capítulo 2 de los resultados	253
ANEXO 2. Material suplementario del capítulo 3 de los resultados	285

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

1-DE	Electroforesis monodimensional
2-DE	Electroforesis bidimensional
μESI	Microelectrospray o microspray
ACBP1	Proteína de unión a los acil-CoAs de tipo 1
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ALA	Ácido linolénico
AMP	Adenosin monofosfato
ARA	Ácido araquidónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP III	Panel III de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional para la Educación sobre el Colesterol de los E.E.U.U.
ATP	Adenosin trifosfato
BHZ	Biotina hidrazida
BLAST	Programa bioinformático de alineamiento de secuencias de tipo local
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
CID	Disociación inducida por colisión
COX	Ciclooxygenasas
DHA	Ácido docosahexaenoico
DIGE	Electroforesis diferencial en gel
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
ELOVL2	Elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 5
ELOVL5	Elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 5
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESI	Electrospray o electronebulización
FABPs	Proteínas de unión a los ácidos grasos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDR	Tasa de error o porcentaje de asignaciones falsas

FTICR	Espectrómetro de masas de resonancia ciclotrónica de iones por Transformada de Fourier
FTSC	Fluoresceína-5-tiosemicarbazida
FUFOSE	Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa
FXR	Receptor X farnesoide
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HFHS	Dieta alta en grasa, alta en sacarosa
HNF-4α	Factor nuclear 4 alfa de hepatocito
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
ICAT	Marcaje isotópico diferencial
IEF	Isoelectroenfoque o enfoque isoeléctrico
IPG	Gradiente inmovilizado de pH
IRS	Receptor de insulina
IT	Trampa iónica
iTRAQ	Marcaje isotópico diferencial para la cuantificación absoluta y relativa
LA	Ácido linoleico
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a un equipo de espectrometría de masas
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LIT	Trampa iónica lineal
LOX	Lipooxigenasas
LXR	Receptor X el hígado
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MALDI	Ionización/desorción por láser asistida por matriz
MCO	Oxidación catalizada por metal
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MS	Espectrometría de masas
NADPH	Nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
NCBI_{nr}	Base de datos no redundante del NCBI
nESI	Nanoelectrospray o nanospray

NFκB	Factor nuclear kappa B
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PLA2	Fosfolipasa A2
PTM	Modificación postraducciona
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RXR	Receptor activado por el ácido cis-retinoico
SD	Ratas Sprague-Dawley
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS
SHROB	Ratas genéticamente obesas, espontáneamente hipertensas
SILAC	Marcaje de cultivos celulares con aminoácidos marcados con isótopos estables
SMet	Síndrome metabólico
SREBPs	Proteínas de unión al elemento regulador del esterol
SSP	Número estándar de spot
STRING	Programa bioinformático de redes de interacciones entre proteínas
SWISS-PROT	Base de datos proteica del Instituto suizo de Bioinformática
TMTs	Etiquetas para espectrometría de masas en tándem
TOF	Tiempo de vuelo
TrEMBL	Base de datos de proteínas traducidas del EMBL
UPLC	Cromatografía líquida de ultra eficiencia
WHO	Organización Mundial de la Salud
WKY	Ratas Wistar Kyoto



I. RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2 se sitúan entre los principales problemas de salud que afectan a la población de los países desarrollados, en gran parte como consecuencia del consumo de la llamada “dieta occidental”, que se caracteriza por una elevada densidad calórica, un desequilibrio en la proporción de ácidos grasos omega-6 y omega-3 en favor de los primeros y un alto contenido en grasas saturadas, grasas *trans*, colesterol y azúcares refinados.

Estas enfermedades inducidas por la dieta están frecuentemente precedidas por el desarrollo de alteraciones metabólicas entre las que se incluyen la obesidad, la resistencia a insulina, la hiperglucemia, la dislipidemia y la hipertensión. La coexistencia de al menos tres de estas alteraciones en un mismo individuo determina el diagnóstico del conocido como síndrome metabólico (SMet), un trastorno multifactorial que eleva de manera significativa el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2.

Dada la importancia del problema, la comunidad científica ha intentado identificar los mecanismos responsables de la aparición y progresión de estas alteraciones metabólicas, con la finalidad de diseñar estrategias específicas que minimicen o inhiban los efectos del consumo de este tipo de dietas sobre la salud humana.

Como resultado de estas investigaciones, numerosos estudios realizados tanto en modelos animales como en humanos han establecido un vínculo entre el estrés oxidativo y las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta. Se ha propuesto que el estrés oxidativo podría ser el factor común que unifica la constelación de trastornos que caracterizan al SMet y que determina la aparición y la progresión de las complicaciones asociadas al mismo. Desde un punto de vista teórico, las estrategias nutricionales encaminadas a evitar la sobreproducción intracelular o extracelular de radicales libres podrían contribuir a normalizar la activación de las rutas metabólicas que conducen a la aparición de la diabetes y contrarrestar la disfunción endotelial que da lugar a las complicaciones cardiovasculares. El diseño de este tipo de estrategias específicas requiere de una mayor labor investigadora que permita identificar las rutas metabólicas concretas implicadas en la respuesta del organismo al estrés oxidativo inducido por la dieta.

La suplementación con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de origen marino, especialmente los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) constituye una de las estrategias nutricionales empleada para balancear el desequilibrio en la proporción entre los PUFAs omega-6/omega-3 asociado a la actual dieta occidental y minimizar su

posible efecto perjudicial. Aunque los beneficios del consumo de EPA y DHA sobre las alteraciones que caracterizan el SMet han sido demostrados en diversos estudios encontrados en la bibliografía, se desconocen muchos aspectos de sus mecanismos específicos de acción así como de las dosis óptimas requeridas para conseguir dichos efectos.

Una cuestión controvertida es la influencia fisiológica que estos ácidos grasos ejercen sobre el estrés oxidativo. Teóricamente, el consumo de dietas muy concentradas en omega-3 PUFAs podría conducir a un aumento de la peroxidación lipídica *in vivo*, puesto que la susceptibilidad de los ácidos grasos a la oxidación es directamente dependiente de su grado de insaturación. Sin embargo, los datos recogidos en la bibliografía no son concluyentes, por lo que el papel de los omega-3 PUFAs de la dieta sobre la modulación de homeostasis redox en los organismos vivos es, gran medida, desconocido.

En los estudios sobre estrés oxidativo, la elección de marcadores adecuados es fundamental para obtener datos fiables y reproducibles. En este sentido, la carbonilación de proteínas se ha empleado como biomarcador general de estrés oxidativo en numerosos estudios nutricionales. Sin embargo, existe muy poca información sobre la influencia del estrés oxidativo derivado de la dieta en la regulación redox de proteínas específicas, y menos aún, de la acción de componentes de la dieta como el EPA y el DHA.

Ante este escenario, el objetivo global de esta tesis doctoral consistió en el estudio de los mecanismos que subyacen a las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta, enfocado desde la perspectiva de las proteínas celulares, y empleando para ello herramientas de la proteómica redox. Dichas metodologías permitieron caracterizar los perfiles de carbonilación proteica asociados a estos trastornos, así como cuantificar el nivel relativo de carbonilación de las proteínas celulares con el fin de identificar las proteínas específicas modificadas y las rutas bioquímicas implicadas en la aparición y desarrollo de las alteraciones. Asimismo, la investigación evaluó el efecto que ejerce el consumo de las distintas series de PUFAs de la dieta sobre el proteoma redox, con especial hincapié en la determinación del efecto protector que los omega-3 PUFAs de origen marino frente al daño oxidativo ligado a las alteraciones metabólicas. Adicionalmente, se investigó el posible papel diferencial sobre la oxidación proteica de las cantidades relativas de EPA y DHA en la dieta, mediante el análisis de la respuesta de las proteínas celulares a aceites de pescado conteniendo tres proporciones distintas de EPA:DHA (1:1, 2:1 y 1:2), que son las proporciones más frecuentes en los alimentos marinos.

Además del efecto sobre el estado redox del proteoma, se ha descrito que EPA y DHA pueden ejercer su acción beneficiosa modulando la expresión génica. Sin embargo, existe muy poca información disponible de la actividad de estos componentes sobre la regulación directa de los niveles de las proteínas celulares. En consecuencia, la tesis presentada evaluó el efecto de los omega-3 PUFAs de origen marino sobre la regulación de los niveles de las proteínas celulares y de su acción combinada con el poder antioxidante aportado por la inclusión en la dieta de polifenoles de uva. El objetivo último de esta investigación fue la identificación de proteínas diana que permitan el diseño de estrategias específicas encaminadas al tratamiento de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta occidental.

Para alcanzar estos objetivos globales, como primera aproximación se investigaron los perfiles de carbonilación proteica asociados al consumo de los diferentes PUFAs de la dieta (ω -6 LA, ω -3 ALA, ω -3 EPA y ω -3 DHA). Asimismo, se evaluó si el efecto de los omega-3 PUFAs de origen marino era dependiente de las proporciones relativas de EPA y DHA presentes en la dieta.

La consecución de estos objetivos parciales se logró mediante un diseño experimental en el que ratas hembra de la cepa consanguínea Wistar Kyoto (WKY) recibieron una dosis oral semanal de un suplemento que contenía, alternativamente, aceite de soja, con una elevada proporción en ω -6 LA, aceite de lino, con una elevada proporción en ω -3 ALA, o tres tipos de aceite de pescado, todos con una elevada proporción en ω -3 EPA y DHA, pero con diferentes proporciones relativas de estos PUFAs. En concreto, se emplearon las proporciones de EPA:DHA 1:1, 2:1 y 1:2.

Tras 13 semanas de intervención, se determinó el nivel de carbonilación total y específico de las proteínas del plasma, el riñón, el músculo esquelético y el hígado en cada uno de los cinco grupos experimentales, mediante la aplicación de una estrategia proteómica basada en el marcaje fluorescente de los carbonilos proteicos con el reactivo fluoresceína-5-tiosemicarbazida (FTSC). La resolución de las proteínas carboniladas se realizó en geles de 1-DE o 2-DE, y se efectuó la cuantificación relativa del nivel de carbonilación total o específico de las proteínas mediante el análisis densitométrico de los geles. El último paso del protocolo fue la identificación de las proteínas carboniladas mediante LC-ESI-IT-MS/MS. Adicionalmente, el estudio proteómico se completó con la realización de medidas biométricas y bioquímicas que permitieron caracterizar el estado de salud general de los animales.

La intervención nutricional con las tres mezclas de EPA y DHA mostró un efecto beneficioso general con respecto a los grupos suplementados con ω -3 ALA y especialmente con los grupos ω -6 LA, que se reflejó en la disminución de los niveles generales de carbonilación proteica en los tejidos analizados, en el notable descenso de los niveles de ácidos grasos totales en el plasma, en la alteración de los perfiles de los ácidos grasos libres en el plasma y en la composición ácida de la membrana de los eritrocitos, donde se incrementó significativamente el contenido en EPA y DHA y se redujo el contenido en ARA. Asimismo, los resultados evidenciaron que este efecto beneficioso depende de la proporción relativa de EPA y DHA en la dieta, puesto que, de las tres proporciones de EPA y DHA ensayadas, la mezcla 1:1 resultó ser la más efectiva, sobre todo en la protección del daño oxidativo de las proteínas.

El análisis de los perfiles de carbonilación proteica en los distintos tejidos estudiados mostró que los ácidos grasos ω -3 de origen marino ejercen un efecto selectivo sobre el estado de carbonilación de las proteínas celulares. EPA y DHA disminuyeron los niveles de carbonilación de la actina en el músculo esquelético, la albúmina en el plasma y en el hígado, donde también se encontró un nivel menor de carbonilación en la argininosuccinato sintetasa (ASS) y la 3- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (AKR). Solo una proteína, la aspartato transaminasa mitocondrial (AST2), elevó su nivel de carbonilación tras el consumo de los aceites de pescado. La alteración de estas proteínas refleja que los omega-3 pueden modular el metabolismo de los lípidos, del nitrógeno y la defensa antioxidante mediante la modulación del estado redox de las proteínas.

Como segunda aproximación al estudio de las alteraciones metabólicas relacionadas con la dieta, se investigaron los perfiles de carbonilación asociados a un modelo animal de SMet. El estudio se realizó empleando un modelo genético del SMet, en concreto las ratas SHROB (genéticamente obesas, espontáneamente hipertensas), y como grupo control, se utilizaron ratas hembra WKY.

El estudio de los perfiles de carbonilación proteica del plasma, el hígado y el músculo esquelético de estas ratas se realizó mediante la aplicación del protocolo proteómico anteriormente descrito, basado en el marcaje con FTSC, y se complementó con la determinación de parámetros biométricos y bioquímicos marcadores del SMet. Con el objetivo de distinguir la carbonilación proteica intrínseca de los animales SHROB de la posible carbonilación modulada por la dieta, tanto las ratas SHROB como las WKY

recibieron una dosis oral semanal de aceite de soja o aceite de lino, durante las 13 semanas de duración del experimento.

Atendiendo a los resultados obtenidos, la administración de los suplementos de lino o soja no modificó los perfiles de carbonilación ni los marcadores bioquímicos del SMet en las ratas SHROB. Sin embargo, se encontraron numerosas diferencias al comparar las cepas WKY y SHROB entre sí. En primer lugar, los datos bioquímicos y biométricos confirmaron que las ratas SHROB sufrían de SMet. En segundo lugar, el SMet presente en estas ratas se asoció a un patrón de carbonilación, tanto a nivel global como individual, distinto al encontrado en la cepa sana WKY.

En concreto, las ratas SHROB presentaron niveles generales de carbonilación proteica superiores a las WKY en el músculo esquelético y, de manera opuesta, el nivel global de carbonilación en plasma e hígado fue inferior en el modelo de SMet.

Por su parte, el análisis detallado de los perfiles de carbonilación en el hígado, reflejó una respuesta desigual de las proteínas hepáticas ante la carbonilación inducida por las alteraciones del SMet. En particular, cuatro proteínas hepáticas, pertenecientes al metabolismo de los lípidos, la regulación redox y la actividad chaperona (aldehído deshidrogenasa mitocondrial o ALDH2, proteína disulfuro isomerasa o PDI, proteína disulfuro isomerasa A3 o PDIA3, trans-2-enoil-CoA reductasa peroxisomal o PECCR) incrementaron significativamente su nivel de carbonilación en las ratas SHROB, pese al menor grado de carbonilación global del hígado con respecto a las ratas WKY. Por el contrario, otras cuatro proteínas hepáticas (albúmina, AKR, alcohol deshidrogenasa 1 o ADH1 y catalasa), implicadas también en la respuesta antioxidante y el metabolismo de los lípidos, redujeron su nivel de carbonilación en relación a las ratas WKY. En el músculo esquelético, la enzima ALDOA, relacionada con la disfunción muscular, se identificó como la diana principal de las alteraciones del SMet, incrementando de manera significativa su nivel específico de carbonilación frente al modelo sano. La investigación realizada permitió determinar el perfil de carbonilación que acompaña al SMet, y podría ayudar a identificar las rutas de señalización redox alteradas en estos modelos animales del síndrome.

Como tercera aproximación, se investigaron los perfiles de carbonilación asociados a las alteraciones metabólicas inducidas en un modelo animal tras el consumo de una dieta alta en grasa saturada y en azúcares refinados, similar a la “dieta occidental”. Como modelo de estudio se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (SD), que fueron alimentadas

durante 22 semanas con una dieta alta en grasa y sacarosa (HFHS). El grupo control fue alimentado con una dieta estándar comercial.

Al igual que con el modelo genético del SMet, el estudio de los perfiles de carbonilación proteica se realizó en el plasma, el hígado y el músculo esquelético, empleando el mismo protocolo basado en la derivatización con FTSC. El estudio se complementó con la determinación de parámetros biométricos y bioquímicos que permitieron evaluar las alteraciones inducidas en las ratas tras el consumo de la dieta HFHS.

Los resultados obtenidos mostraron que las ratas SD alimentadas con la dieta HFHS desarrollaron obesidad abdominal, resistencia a insulina y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), y que dichas alteraciones metabólicas se acompañaron por un incremento en los niveles globales de carbonilación de las proteínas del plasma y del hígado. Sin embargo, no se detectaron cambios en la carbonilación de las proteínas del músculo esquelético.

El estudio de los perfiles de carbonilación proteica permitió detectar las dianas específicas de carbonilación que acompañan a dichas alteraciones inducidas por la dieta HFHS, revelando de nuevo la selectividad del proceso. El análisis de los datos obtenidos permitió identificar ocho proteínas que incrementaron significativamente su nivel de carbonilación en estas ratas con respecto al control. Estas proteínas fueron: la albúmina en el plasma y el hígado, implicada en el transporte de lípidos y la defensa antioxidante, ciertas proteínas hepáticas implicadas en el ciclo de la urea y en el metabolismo de las proteínas como la carbamoil fosfato sintetasa 1 (CPS1), la ASS1 o la glutamato deshidrogenasa 1 (GDH1), proteínas implicadas en la cadena de transporte de electrones como la subunidad beta de la ATP sintasa mitocondrial, en el metabolismo del calcio como la regucalcina, en la estructura celular como la actina citoplasmática y en la defensa antioxidante como la ALDH2. Solo una proteína, la AST2, disminuyó su nivel de carbonilación tras el consumo de la dieta hipercalórica. La investigación realizada permitió determinar el perfil de carbonilación que acompaña a las primeras etapas del desarrollo de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta, revelando dianas específicas que podrían ser utilizadas como marcadores de alteración temprana.

Como aproximación final, se abordó el estudio de la regulación de los niveles de las proteínas del hígado ejercida por los omega-3 PUFAs de origen marino cuando son administrados en el contexto de una dieta saludable o en el contexto de una dieta inductora de

alteraciones metabólicas, como lo es una dieta alta en grasa y sacarosa. Adicionalmente, se evaluó el efecto de su combinación con antioxidantes como son los polifenoles de la uva. El análisis cuantitativo del proteoma se acompañó con determinaciones biométricas y bioquímicas que permitieron correlacionar los cambios encontrados con el estado de salud general de las ratas intervenidas.

Para conseguir el contexto sano, un grupo de ratas hembra WKY se alimentaron durante 25 semanas con una dieta estándar comercial. Para conseguir el contexto insano, inductor de alteraciones metabólicas, un grupo paralelo de ratas WKY fue alimentado con una dieta HFHS. Los dos grupos recibieron un suplemento de aceite de pescado o polifenoles de uva o una mezcla de ambos, empleando como aceite control, el aceite de soja.

Mediante la aplicación de dos herramientas complementarias de la proteómica cuantitativa, en concreto el marcaje iTRAQ acoplado a nano-LC-MS/MS y el análisis basado en geles 2D-DIGE, se descubrió que la capacidad de los aceites de pescado, los polifenoles o su combinación para regular la cantidad de las proteínas del hígado depende, en gran medida, del contexto dietético en el que se incluyen.

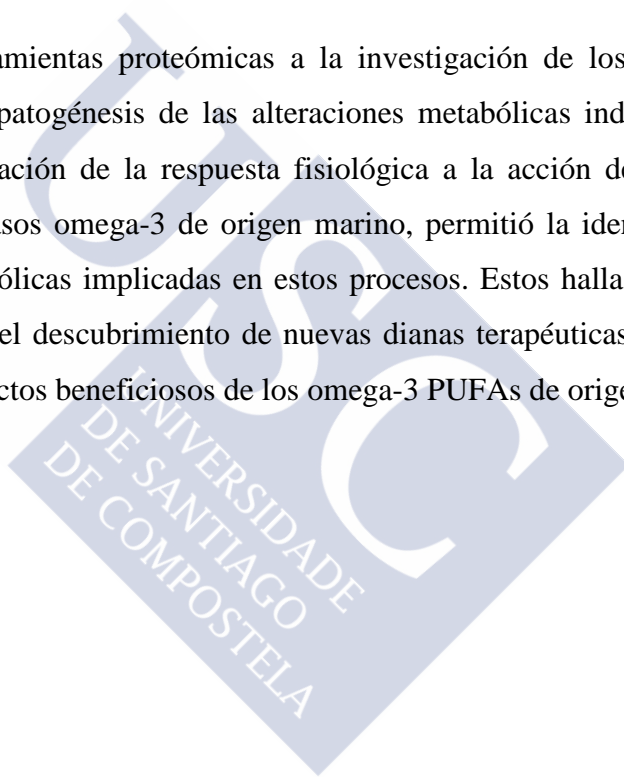
En el contexto saludable, 10 proteínas se encontraron alteradas por el conjunto de los tres suplementos con respecto al grupo control suplementado con el aceite de soja. En el contexto insano, hasta 45 proteínas se mostraron alteradas respecto al control de soja considerando la suma de las proteínas alteradas de manera independiente por los tres suplementos evaluados. De manera absoluta, atendiendo al número total de proteínas afectadas, los resultados obtenidos mostraron que la respuesta del proteoma hepático a los suplementos fue mayor en el contexto insano. Asimismo, apenas se encontraron proteínas alteradas en común entre los dos grupos, reflejando que la actividad específica de los suplementos sobre la regulación del proteoma fue altamente dependiente del contexto dietario. Por otra parte, en ambos contextos, el aceite de pescado se reveló como la fuerza motriz principal para regular los niveles de las proteínas hepáticas, y que la inclusión de los polifenoles fue capaz de modular la respuesta provocada por el aceite de pescado, mejorando el efecto conseguido.

Con respecto a los efectos fisiológicos, la combinación de los aceites de pescado con los polifenoles de uva fue especialmente eficaz en la modulación de las rutas metabólicas afectadas como consecuencia del consumo de dietas inductoras de alteraciones metabólicas, consiguiendo mejorar diversos parámetros bioquímicos, reducir la concentración de enzimas implicadas en la lipogénesis y la glucólisis hepática, incrementar enzimas de la beta oxidación

de ácidos grasos, mejorar la señalización de la insulina y disminuir el estrés del retículo endoplásmico y la carbonilación proteica en este contexto insano.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral demostraron que las alteraciones inducidas por la dieta se caracterizan por un perfil de carbonilación proteica específico, que depende del tejido analizado y de la severidad de las alteraciones presentes, y que puede ser modulado de manera selectiva por la inclusión en la dieta de los ácidos grasos ω -3 EPA y DHA. Asimismo, los ω -3 PUFAs de origen marino y otros compuestos bioactivos como los polifenoles de uva son capaces de regular de manera específica los niveles de las proteínas celulares, en una acción altamente dependiente del tipo de dieta en la que se incluyen.

La aplicación de las herramientas proteómicas a la investigación de los mecanismos bioquímicos implicados en la patogénesis de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta, así como a la caracterización de la respuesta fisiológica a la acción de compuestos bioactivos como los ácidos grasos omega-3 de origen marino, permitió la identificación de nuevas proteínas y rutas metabólicas implicadas en estos procesos. Estos hallazgos suponen un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y de nuevos campos de aplicación de los efectos beneficiosos de los omega-3 PUFAs de origen marino.





II. INTRODUCCIÓN

1. DIETA Y SALUD

1.1. Aspectos evolutivos de la dieta humana

La evolución de los hábitos alimentarios del ser humano desde el Paleolítico hasta la actualidad es un factor importante para entender la aparición de enfermedades que se han convertido en una verdadera epidemia en las sociedades occidentalizadas actuales y que no existían en nuestros ancestros.

Un gran número de estudios antropológicos, nutricionales y genéticos indican que la dieta de los seres humanos, incluyendo aspectos como la ingesta y el gasto de energía, ha cambiado de forma radical en los últimos 10.000 años, momento en el que la Revolución Agrícola puso fin a la era Paleolítica [1].

La Revolución Agrícola, que dio comienzo a la era Neolítica, cambió significativamente el modo de recolección y producción de los alimentos. El cultivo de plantas y la domesticación de animales supuso la aparición de nuevos modelos de subsistencia así como de nuevos hábitos alimentarios, consecuencia de la explotación y mayor disponibilidad de estas fuentes de alimento [2]. Así, a partir de la Revolución Agrícola, los alimentos ricos en almidón, como los cereales de grano y las legumbres, se convierten en alimentos básicos de la dieta humana. También a partir de este momento, los productos lácteos y los aceites vegetales como el aceite de oliva, empiezan a formar parte habitual de la dieta humana [3].

La Revolución Industrial, que comienza hace tan sólo 200 años, marca la última etapa en la evolución de la dieta humana hasta el momento y es en este periodo donde se producen los cambios más profundos y a mayor velocidad como consecuencia del avance de la tecnología y la introducción de alimentos procesados en la dieta [3].

Con respecto a la dieta en el periodo Paleolítico, las sociedades modernas industrializadas se caracterizan por (Tabla 1):

1. Un incremento en la ingesta y una disminución en el gasto de energía
2. Un incremento en grasas saturadas, omega-6 y grasas *trans* y un descenso en grasas omega-3
3. Una disminución en carbohidratos complejos
4. Un incremento de los cereales de grano y un descenso de frutas y verduras
5. Una disminución de proteínas, antioxidantes y calcio

Tabla 1. Actividad física y características de la dieta humana en la era paleolítica y en la actual sociedad “occidentalizada” [4, 5].

	Paleolítico	Actualidad
Actividad física	Alta	Baja
Dieta		
Densidad energética	Baja	Alta
Ingesta de energía	Moderada	Alta
Contenido en proteína	Alto	Bajo-Moderado
Animal	Alto	Bajo-Moderado
Vegetal	Muy bajo	Bajo-Moderado
Contenido en carbohidratos	Bajo-Moderado	Moderado
Contendio en fibra	Alto	Bajo
Contenido en grasa	Bajo	Alto
Animal	Bajo	Alto
Vegetal	Muy bajo	Moderado-Alto
Contenido total de PUFAs (ω -6 & ω -3)	Alto (2.3 g/día)	Bajo (0.2 g/día)
Proporción ω -6/ ω -3	Baja (1/1)	Alta (15-20/1)
Vitaminas(mg/día):		
Riboflavina	6.49	1.34-2.08
Folato	0.357	0.149-0.205
Tiamina	3.91	1.08-1.75
Vitamina C	604	77-109
Caroteno	5.56	2.05-2.57
(Equivalentes de retinol)	(927)	-
Vitamina A	17.2	7.02-8.48
(Equilaventes de retinol)	(2870)	(1170-429)
Vitamina E	32.8	7-10

Los cambios propiciados por la Revolución Industrial han afectado de manera especial al tipo y cantidad de grasa de la dieta y también a la ingesta de vitaminas C y E, que han cambiado radicalmente sobre todo en los últimos 100 años [6]. En la Figura 1 se muestra la evolución estimada de los aportes calóricos proporcionados por el total de grasa y los distintos tipos de ácidos grasos desde el Paleolítico (cuando los humanos eran cazadores-recolectores) hasta la actualidad, junto con los cambios producidos en los aportes de vitaminas C y E a la dieta.

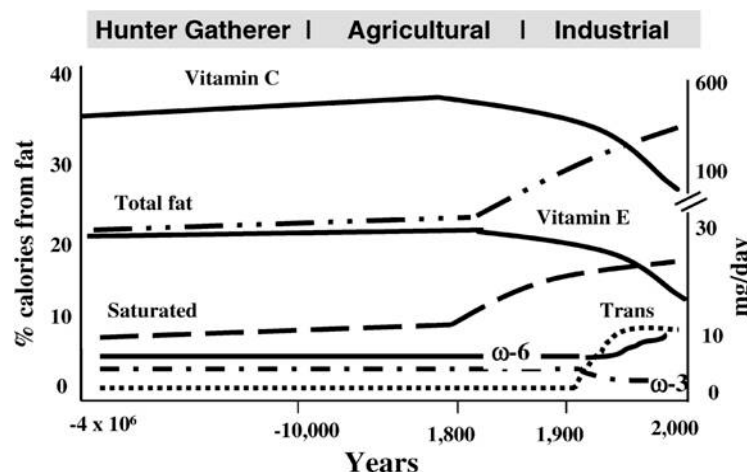


Figura 1. Representación de los porcentajes estimados de grasa y de las diferentes familias de ácidos grasos en las distintas etapas de la nutrición humana extrapolados de los análisis de sección transversal y de observaciones longitudinales realizados en las poblaciones de cazadores-recolectores contemporáneas. Imagen adaptada de la referencia [6].

Tal como se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 1, la actual dieta occidental es “deficiente” en ácidos grasos omega-3 y además presenta una proporción de omega-6/omega-3 de 15-20/1, en lugar de 1/1, que es la proporción presente en la dieta de los animales salvajes y probablemente también, la proporción presente en la alimentación de los humanos paleolíticos.

Esta alteración en las proporciones ingeridas de ácidos grasos debe explicarse por el desarrollo de la tecnología de los alimentos y la agricultura moderna durante el último siglo, que ha propiciado un aumento del contenido en la dieta de ácidos grasos omega-6, un descenso en omega-3 y un aumento de las grasas *trans* [7].

Así, el sector agroindustrial ha contribuido en gran medida al descenso de los ácidos grasos omega-3 en los animales destinados al consumo humano, porque los piensos cultivados para alimentar a los animales domésticos, como por ejemplo la soja, son ricos en omega-6 y pobres en omega-3. Pero además, la agricultura moderna ha disminuido los porcentajes de omega-3 en muchos otros productos como vegetales de hoja verde, huevos e incluso peces de acuicultura, que contienen cantidades inferiores a las presentes en los animales salvajes.

También la producción de aceites vegetales a gran escala, sobre todo a partir de la primera Guerra Mundial, supuso la introducción del método de hidrogenación para solidificar los aceites vegetales. Este proceso de hidrogenación conduce a la formación de ácidos grasos

trans, que tienen efectos perjudiciales sobre la salud ampliamente documentados [8]. Además de estos efectos perjudiciales propios, los ácidos grasos *trans* interfieren con el metabolismo de los ácidos grasos esenciales para el ser humano, en concreto con la desaturación y la elongación tanto de los ácidos grasos omega-6 como omega-3, provocando una disminución de la cantidad disponible para el metabolismo humano de ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico [9]. Las consecuencias negativas de la reducción de los ácidos grasos esenciales omega-3 en la dieta así como el desequilibrio en el balance omega-6/omega-3 serán discutidas en profundidad en la sección 2.

1.2. Consecuencias de la evolución sufrida por la dieta humana

Desde un punto de vista evolutivo, los cambios descritos en la dieta y el estilo de vida se han producido a una tasa superior a la necesaria para permitir la adaptación del genoma humano a dichos cambios [4].

La tasa de mutación espontánea del ADN nuclear se estima en 0.5% por millón de años. Por tanto, en los últimos 10.000 años sólo ha habido tiempo para cambios muy pequeños en nuestros genes, quizás un 0.005% [10]. En consecuencia, se ha asumido que los seres humanos de hoy en día están biológicamente adaptados al entorno de sus ancestros y presentan en su mayoría rasgos genéticos evolucionados durante el periodo Paleolítico (2.6 millones de años hasta hace aproximadamente 10.000 años) [11]. Mientras los genes humanos prácticamente no han cambiado en los últimos 10.000 años, la dieta humana sí que lo ha hecho y de manera significativa (Figura 1). Precisamente esta discordancia evolutiva entre el genoma ancestral y las cualidades nutricionales de los alimentos recientemente introducidos en la dieta humana puede ser el factor subyacente de muchas enfermedades crónicas de la civilización occidental, tal como enuncia la teoría de la evolución discordante [3, 12].

Estas enfermedades crónicas y otras alteraciones total o parcialmente atribuibles a la dieta se han convertido en el principal problema de salud en las sociedades occidentalizadas. Entre ellas, se encuentran la obesidad y el sobrepeso, diferentes tipos de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes tipo 2, hiperlipidemias, hiperinsulinemia, osteoporosis y osteopenia, y cáncer [3].

1.3. Alimentación y estrés oxidativo

El estrés oxidativo es otro factor importante para entender la aparición de enfermedades relacionadas con la dieta.

1.3.1. Definición de estrés oxidativo

El estrés oxidativo fue originalmente definido en 1985 como un desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes, a favor de los primeros [13]. Sin embargo, casi 30 años más tarde, considerando que las células vivas utilizan las reacciones de oxidación-reducción (redox) en procesos fundamentales de regulación redox, colectivamente denominados “señalización redox” y “control redox”, el concepto de estrés oxidativo fue actualizado en 2007 para incluir este aspecto. Por tanto, actualmente se entiende como estrés oxidativo “un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, dando lugar a una interrupción de la señalización y el control redox y/o a daño molecular” [14]. Dependiendo de la ruta de generación o de las principales especies reactivas formadas, el fenómeno del estrés oxidativo puede subdividirse en estrés fotooxidativo, fisiológico, inducido por radiación, nitrosativo o nutricional, entre otros [15].

1.3.2. Prooxidantes: radicales libres y especies reactivas

Un radical libre puede definirse como cualquier especie (átomo o molécula) capaz de existir de manera independiente (de ahí el término de libre) y que contiene uno o más electrones desapareados. Este hecho convierte a los radicales libres en especies altamente reactivas y extremadamente propensas a tomar parte en reacciones químicas [16].

El radical libre más simple es el átomo de hidrógeno, formado por un protón y un único electrón. Ejemplos de radicales centrados en el oxígeno, donde el electrón desapareado está localizado sobre el oxígeno, serían el superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el hidroxilo (OH^{\bullet}). Existen también radicales libres centrados en el azufre como el radical tío (RS^{\bullet}) o centrados en el carbono como el radical triclorometilo (CCl_3^{\bullet}). El óxido nítrico (NO^{\bullet}) es un radical libre donde el electrón desapareado está deslocalizado entre dos átomos distintos (el N y el O) [17].

El término especies reactivas (RS) es más amplio que el de radicales libres, ya que engloba tanto radicales libres como derivados no radicalarios. Las especies reactivas más importantes (Tabla 2), al menos para los organismos aerobios, son las especies reactivas que derivan del oxígeno (ROS) [18] y en segundo lugar, las especies que derivan del nitrógeno

(RNS). En la tabla 2 se muestran algunas de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno más relevantes.

Tabla 2. Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (adaptada de la referencia [17]).

TIPOS DE ESPECIES REACTIVAS (RS)	
Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)	Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS)
Radicales Superóxido, $O_2^{\bullet-}$ Hidroxilo, OH^{\bullet} Peroxilo, RO_2^{\bullet} Alcoxilo, RO^{\bullet} Hidroperoxilo, HO_2^{\bullet}	Radicales Óxido nítrico (monóxido de nitrógeno), NO^{\bullet} Dióxido de nitrógeno, NO_2^{\bullet}
No radicales Peróxido de hidrógeno, H_2O_2 Ácido hipocloroso, $HOCl$ Ácido hipobromoso, $HOBr$ Ozono, O_3 Oxígeno singlete 1O_2	No radicales Ácido nitroso, HNO_2 Catión nitrosilo, NO^+ Anión nitrosilo, NO^- Tetróxido de dinitrógeno, N_2O_4 Trióxido de dinitrógeno, N_2O_3 Peroxinitrito, $ONOO^-$ Ácido peroxinitroso, $ONOOH$ Catión nitronio (nitril), NO_2^+ Alquil peroxinitritos, $ROONO$

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) incluyen tanto radicales del oxígeno como ciertos compuestos no radicalarios que son agentes oxidantes y/o que se convierten fácilmente en radicales ($HOCl$, O_3 , $ONOO^-$, 1O_2 , H_2O_2). Las especies reactivas del nitrógeno (RNS) incluyen los radicales NO^{\bullet} y NO_2^{\bullet} , así como compuestos no radicalarios tales como HNO_2 y N_2O_3 . El $ONOO^-$ se incluye frecuentemente en ambas categorías.

Un aspecto importante de las especies reactivas es que varían en cuanto a su capacidad reactiva. Así, algunas especies son mucho menos reactivas que otras, como por ejemplo, H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ y NO^{\bullet} que reaccionan con un número pequeño de moléculas, mientras que OH^{\bullet} puede reaccionar casi con cualquier especie química. Algunas especies como RO_2^{\bullet} , RO^{\bullet} , $HOCl$, NO_2 , $ONOO^-$ o O_3 poseen reactividades intermedias [17].

En conjunto, las especies reactivas pueden tener su origen en fuentes exógenas (dieta, contaminación, metales pesados, pesticidas, metales de transición, metales pesados...), pero muchas de ellas tienen un origen endógeno y se generan como subproductos de las reacciones bioquímicas normales que tienen lugar dentro de las células [19]. La mitocondria es la principal fuente de ROS, en particular de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , como efecto secundario del flujo de

electrones en la cadena respiratoria [20]. Otros orgánulos que generan especies reactivas son el retículo endoplasmático, los peroxisomas o los lisosomas [21].

1.3.3. Antioxidantes

El otro factor que determina la aparición del estrés oxidativo son las sustancias antioxidantes. En 1989, Halliwell y Gutteridge establecieron que un antioxidante es “cualquier sustancia que cuando se presenta a bajas concentraciones comparadas con un sustrato oxidable, significativamente retrasa o inhibe la oxidación del sustrato” [22].

Al igual que ocurrió con el concepto de “estrés oxidativo”, estos autores redefinieron el concepto de antioxidante para incluir sustancias que indudablemente presentan propiedades antioxidantes pero que no cumplen estrictamente los requisitos de la primera definición. Por ejemplo, la albúmina es un importante antioxidante en el plasma porque entre otras cosas, protege a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) del daño oxidativo [23]. Sin embargo, se presenta a concentraciones molares mucho más elevadas que su sustrato LDL, por lo que considerando su concentración, no sería un antioxidante si nos atenemos a la definición original. Similar es el caso de los sistemas de reparación oxidativa de la célula, las chaperonas o los inhibidores de especies reactivas. Por ello, en 2007 Halliwell y Gutteridge simplificaron su definición original y redefinieron antioxidante como “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana” [24], considerando daño oxidativo como “el daño biomolecular causado por el ataque de especies reactivas hacia los constituyentes de los organismos vivos” [25].

Teniendo en cuenta esta definición, los mecanismos de defensa desarrollados por los organismos para luchar contra el estrés oxidativo pueden dividirse en:

- i. Mecanismos preventivos
- ii. Mecanismos de reparación
- iii. Defensas físicas
- iv. Defensas antioxidantes:
 - a. Enzimáticas como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) o la catalasa.
 - b. No enzimáticas como la vitamina C, vitamina E, glutatión, carotenoides o flavonoides proporcionados por la dieta.

1.3.4. Importancia de la homeostasis redox

En condiciones normales, cada célula del organismo se caracteriza por una concentración particular de electrones (o estado redox) almacenados en muchos constituyentes celulares. El estado redox de una célula y su oscilación determina el funcionamiento celular [26].

El estado redox de una célula se mantiene dentro de un estrecho rango en condiciones fisiológicas normales, de modo similar a la forma en que un sistema biológico regula su pH. Este estado se mantiene por mecanismos llamados de “regulación redox”. El proceso de “regulación redox” protege a los organismos de los diversos tipos de estrés oxidativo y mantiene la “homeostasis redox” controlando el estado redox *in vivo* [15, 27].

Está ampliamente aceptado que tanto ROS como RNS juegan un papel dual como especies perjudiciales y beneficiosas. Los efectos beneficiosos de ROS ocurren a bajas o moderadas concentraciones siendo esenciales en procesos de señalización celular y en la defensa contra agentes infecciosos [28].

En condiciones de estrés oxidativo, el estado de equilibrio de las reacciones prooxidantes/antioxidantes se altera y el exceso de especies reactivas puede dañar los carbohidratos, los lípidos, las proteínas, el ADN y el ARN inhibiendo su función normal. Por ello, el estrés oxidativo se ha implicado en procesos como el envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el cáncer y también en muchas de las enfermedades inducidas por la dieta como las enfermedades cardiovasculares y la diabetes [21, 28]. En la figura 2 se muestran algunos mecanismos implicados en el mantenimiento o ruptura del estado redox de la célula.

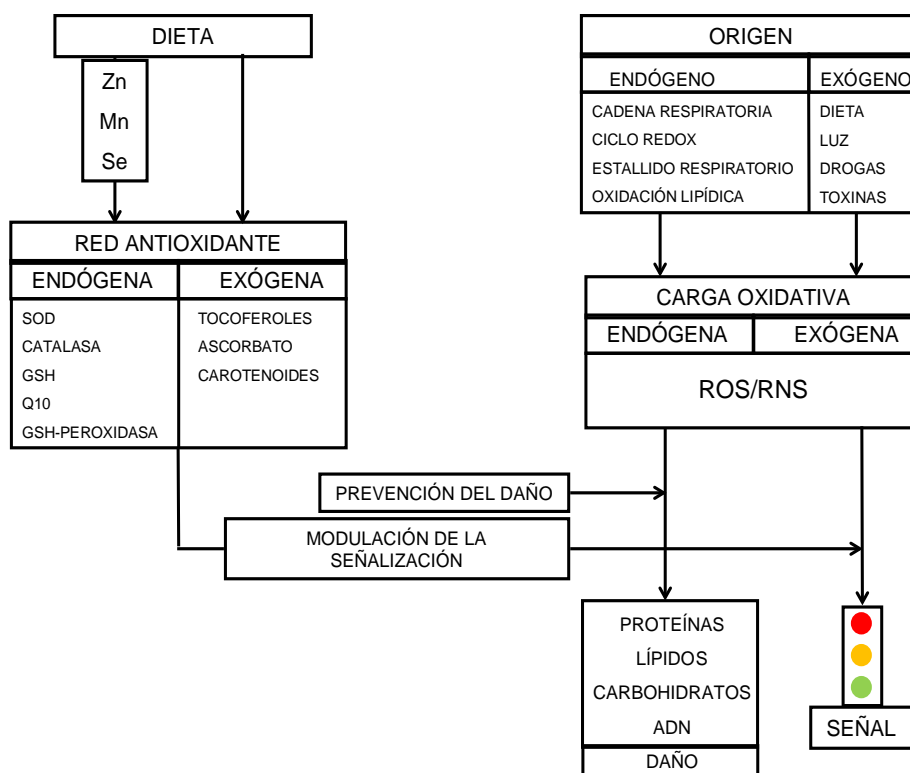


Figura 2. Formación de especies reactivas y algunos mecanismos de regulación redox.

1.3.5. Enfermedades metabólicas inducidas por la dieta y el estrés oxidativo

Como se ha mencionado anteriormente, la dieta es un factor clave tanto para el mantenimiento como para la ruptura de la homeostasis redox en los sistemas vivos. Su importancia es tal que se puede hablar de un estrés oxidativo provocado exclusivamente por el tipo de dieta ingerida. Así, se ha definido como estrés oxidativo nutricional o “dietario” el desequilibrio del estado redox resultante de una excesiva carga oxidativa o de un inadecuado aporte de nutrientes que favorezca las reacciones prooxidantes [29].

El estrés oxidativo nutricional ha sido implicado en la aparición y el desarrollo de diversas patologías humanas, tales como el síndrome metabólico (SMet), la diabetes o las enfermedades cardiovasculares [30].

El SMet es una condición multifactorial que agrupa una serie de alteraciones metabólicas que incrementan el riesgo de padecer diabetes y enfermedades cardiovasculares [31, 32]. Se estima que entre el 20 y el 30% de la población adulta en los países desarrollados sufre SMet,

convirtiéndolo en una auténtica epidemia en las sociedades “occidentalizadas” [33].

La naturaleza multifactorial del SMet supone una complicación a la hora de establecer una definición unánime del mismo y todavía se discute qué factores deben ser incluidos a la hora de realizar un diagnóstico. Según la definición del ATP III (“National Cholesterol Education Program’s Adult Treatment Panel III”) [34], probablemente la más utilizada, el SMet se caracteriza por la presencia de diferentes combinaciones de tres o más de las siguientes alteraciones: obesidad abdominal, hipertensión sanguínea, hiperglucemia (niveles elevados de glucosa en sangre) y dislipidemia (elevación de los triglicéridos y de las lipoproteínas de baja densidad o LDL y/o disminución de las lipoproteínas de alta densidad o HDL) [35].

En los últimos años, algunos autores han propuesto que el estrés oxidativo debe ser considerado como un componente más para la caracterización del síndrome [32], apoyándose en la evidencia que demuestra que los pacientes de SMet presentan niveles incrementados de estrés oxidativo [31, 32, 36].

El estrés oxidativo se ha asociado con todos los componentes individuales del SMet [36, 37] y con la aparición de las complicaciones cardiovasculares [38]. Incluso, algunos estudios sugieren que el estrés oxidativo es un factor que precede a la aparición de algunos desórdenes que caracterizan al síndrome. En concreto, la sobreproducción de ROS en el tejido adiposo y el hígado parece preceder a la aparición de obesidad y de resistencia a insulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasa [39].

La obesidad parece contribuir de manera significativa al estrés oxidativo que caracteriza al síndrome. En este sentido, numerosos estudios realizados tanto en modelos animales [40-42] como en humanos [43-45] correlacionan la obesidad con un incremento en los marcadores de estrés oxidativo. Existen múltiples fuentes de estrés oxidativo en relación con la obesidad, pero parece ser que el incremento del tejido adiposo y en particular, de la adiposidad ectópica en hígado y músculo esquelético está positivamente correlacionada con los niveles sistémicos y tisulares de los biomarcadores de estrés oxidativo [36]. Asimismo, se ha comprobado que la pérdida de peso inducida por restricción calórica y por el aumento del ejercicio aeróbico mejora dichos biomarcadores, apoyando el vínculo existente entre obesidad y estrés oxidativo [46]. Sin embargo, la obesidad abdominal no es el único componente que causa un incremento del estrés oxidativo en el SMet, ya que se ha comprobado que pacientes

obesos presentan niveles más bajos de estrés oxidativo que pacientes obesos con el síndrome [47, 48].

La relación entre estrés oxidativo y resistencia a insulina también ha sido demostrada en diversos modelos animales [49, 50] y humanos [51, 52]. La primera evidencia del vínculo entre ROS y la insulina deriva de la observación de que elevadas concentraciones de H_2O_2 promueven la señalización de la insulina e inducen las acciones metabólicas típicas de esta hormona [53]. En particular, puesto que H_2O_2 utiliza la misma vía de señalización que la insulina, se ha observado que estimula la carga de glucosa en adipocitos y el músculo [54], la translocación del transportador de glucosa GLUT4 y la síntesis lipídica en los adipocitos [55]. Se ha descrito que el aumento en la generación de H_2O_2 por el tejido adiposo en ratones obesos podría preceder a la aparición de la diabetes [49]. Por otra parte, el estrés oxidativo puede impedir que la insulina produzca sus efectos metabólicos normales, ya que conduce a la activación de la cascada de las MAP kinasas, lo que a su vez conduce a la reducción del contenido de las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS), necesarias para la función de la hormona [56]. Otra prueba del vínculo entre estrés oxidativo y resistencia a insulina se pone de manifiesto por el hecho de que el tratamiento con compuestos antioxidantes como inhibidores de la NADPH oxidasa [57], la coenzima Q10 [58] o el carvedilol [59], reducen la resistencia a insulina en modelos animales de SMet.

Con respecto a la dislipidemia, diversos estudios han demostrado una correlación positiva entre el estrés oxidativo y niveles elevados de LDL, triglicéridos y reducidos de HDL [60, 61]. De los parámetros que caracterizan esta alteración, Zelzer y colaboradores han propuesto que el nivel de HDL es el factor determinante, ya que la reducción del nivel HDL determina el incremento de la peroxidación lipídica de manera independiente al sexo, la edad o la presencia de otros componentes del SMet [62].

Finalmente, el estrés oxidativo parece contribuir a la etiología de la hipertensión en animales [63] y en humanos [64, 65]. De hecho, pacientes hipertensos presentan una defensa antioxidante deficiente [66] así como niveles incrementados de marcadores de estrés oxidativo en el plasma [65, 66]. Pero además, diferentes estudios epidemiológicos y clínicos han vinculado el consumo de dietas ricas en antioxidantes con la reducción de la hipertensión sanguínea [64, 67, 68] apoyando el papel del estrés oxidativo en la patogénesis del trastorno.

Considerando estos datos, se ha hipotetizado que el estrés oxidativo podría ser el factor que unifica los constituyentes que caracterizan al SMet y que determina la aparición de las

complicaciones asociadas al mismo (diabetes y enfermedades cardiovasculares) [38]. Desde este punto de vista, evitar la sobreproducción de intracelular o extracelular de ROS en estos pacientes podría contribuir a normalizar la activación de las rutas metabólicas que conducen a la aparición de la diabetes y contrarrestar la disfunción endotelial que da lugar a las complicaciones cardiovasculares.



2. ALIMENTACIÓN FUNCIONAL, ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3 DE CADENA LARGA DE ORIGEN MARINO Y OTROS COMPUESTOS BIOACTIVOS

2.1. Alimentos funcionales y nutraceuticos

Aunque no existe una definición oficial consensuada, los alimentos o compuestos que promueven la salud y el bienestar humano se clasifican generalmente en dos categorías: los alimentos funcionales y los nutraceuticos.

Con respecto a los alimentos funcionales, en 1998, la Comisión Europea promovió una acción coordinada, llamada “Funcional Food Science in Europe” o “FUFOSE”, en la que un grupo de expertos europeos en nutrición y otras ciencias relacionadas, acordaron una definición práctica del concepto de alimento funcional [69, 70]. Para FUFOSE, “un alimento puede ser considerado como funcional si está satisfactoriamente demostrado que afecta beneficiosamente a una o más funciones específicas del cuerpo, más allá de sus adecuados efectos nutricionales, y lo hace de una manera que es relevante para el estado de bienestar y salud o para la reducción del riesgo de una enfermedad”. Además, acordaron que no se considerarían alimentos funcionales aquellos productos en formato de píldora, cápsula o cualquier forma de suplemento dietario y que además, deberían ser consumidos como parte normal de la dieta.

Por tanto, desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede ser:

1. Un alimento natural, no modificado
2. Un alimento en el que uno de sus componentes ha sido aumentado a través de condiciones especiales de crecimiento, alimentación o medios biotecnológicos
3. Un alimento al que se le ha añadido un compuesto que proporcione beneficios
4. Un alimento al que se le ha eliminado un componente por medios tecnológicos o biotecnológicos que hace que el alimento proporcione beneficios que no serían posibles en su forma original
5. Un alimento en el que uno de los componentes ha sido reemplazado por un componente alternativo con propiedades beneficiosas
6. Un alimento en el cual un componente ha sido modificado por medios enzimáticos, químicos o tecnológicos para proporcionar un beneficio
7. Un alimento en el que la biodisponibilidad de un componente ha sido modificada
8. Una combinación de cualquiera de las anteriores

Algunos ejemplos de alimentos funcionales serían el pescado, la soja, el arroz, el té o el tomate, entre los alimentos tradicionales, y las leches enriquecidas con omega-3 o sin lactosa, entre los alimentos procesados.

El término de nutraceutico, resultante de la unión entre los términos “nutrición” y “farmacéutico”, fue acuñado en 1989 por el doctor Stephen DeFelice, presidente de la “Fundación para la Innovación en Medicina”, (Foundation for Innovation in Medicine, FIM), en Cranfor, Nueva Jersey, EE.UU [71]. De acuerdo con DeFelice, un nutraceutico es “cualquier alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades”.

Actualmente, los nutraceuticos son causa de un acalorado debate porque su concepto redefine las líneas divisorias tradicionales entre los alimentos y los medicamentos. Desde un punto de vista práctico, el concepto de nutraceutico se aplica a compuestos o productos promotores de la salud que han sido aislados o purificados de fuentes alimentarias y que generalmente se venden en una forma médica, normalmente como píldoras [72].

Algunos ejemplos de nutraceuticos serían las cápsulas de aceite de pescado, extractos de hierbas, píldoras de glucosalina y condroitín sulfato, tabletas multivitamínicas que contienen luteína, píldoras antihipertensivas que contienen péptidos bioactivos procedentes de proteínas de pescado, polifenoles de uva, isoflavonas de soja, etc.

Puesto que no existe en ningún caso una definición legal ni global de estos términos, la línea que separa los conceptos de alimento funcional y nutraceutico es muy difusa y depende en gran medida de la definición que se utilice. Por ejemplo, algunos autores [73] proponen que un alimento funcional es el que proporciona al cuerpo la cantidad requerida de vitaminas, grasas, proteínas, carbohidratos, etc., necesarios para una supervivencia saludable y que además ha sido cocinado o preparado usando “la inteligencia científica” con o sin conocimiento de cómo o por qué está siendo usada. Cuando el alimento funcional está dirigido a la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad(es) y/o un trastorno(s) que no sean anemia, se le llama nutraceutico. Se excluye la anemia porque la mayoría de alimentos funcionales actúan de alguna manera como antianémicos. Para algunos autores, la excepción de la anemia se considera como una clara distinción entre ambos conceptos [74].

En cualquier caso, con independencia de la definición empleada, los alimentos funcionales y los nutraceuticos deben ser siempre seguros, inocuos para el ser humano, tanto desde un punto de vista general como específico si tienen un uso dirigido.

2.2. Omega-3 PUFAs de origen marino

El pescado en general es un alimento muy completo, con un elevado valor nutritivo ya que aporta proteínas de alto valor biológico, vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles y minerales [75]. Pero quizás sea su contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, de sus siglas en inglés “polyunsaturated fatty acids”) omega-3, principalmente los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), lo que justifica su utilización como alimento funcional y nutracéutico [72]. Puesto que el EPA y el DHA se encuentran entre los principales compuestos bioactivos del pescado, es importante conocer los aspectos relacionados con su metabolismo y sus mecanismos de acción, una vez que son ingeridos.

2.2.1. Clasificación de los PUFAs de la dieta

Los PUFAs son ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces en su cadena carbonada. Las dos familias de PUFAs más frecuentes en la naturaleza y que tienen una mayor relevancia para la salud y la nutrición humanas, son la familia de los omega-6 (o n-6) y la de los omega-3 (o n-3). Esta clasificación de los PUFAs se basa en la localización del primer doble enlace a partir del grupo metilo final de la molécula, llamado extremo omega o n. Así, en los ácidos grasos omega-6, el primer doble enlace se sitúa entre el sexto y el séptimo átomo de carbono y en los ácidos grasos omega-3, el primer doble enlace se sitúa entre el tercer y el cuarto átomo de carbono [76]. En la figura 3 se muestra la estructura química de los principales PUFAs presentes en la dieta humana.

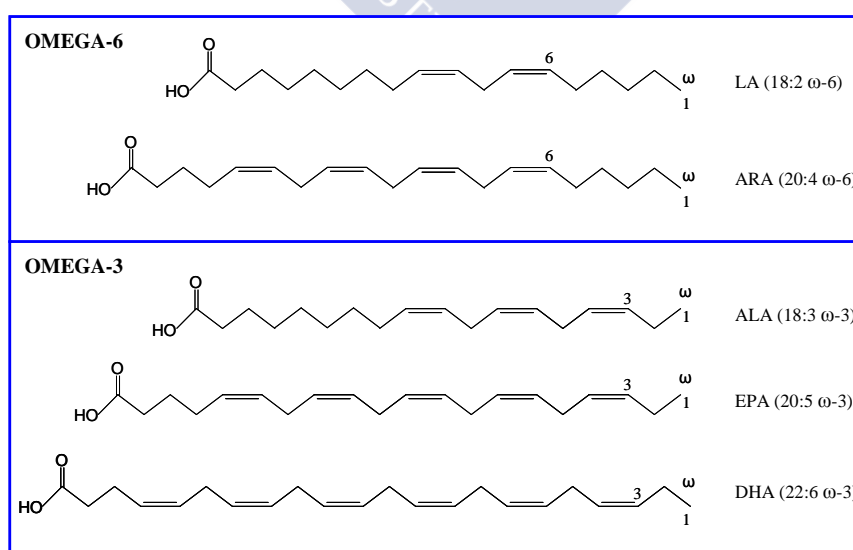


Figura 3. Estructura química de los principales ácidos grasos poliinsaturados de las series omega-6 y omega-3.

Los PUFAs omega-6 están representados por el ácido linoleico (LA; 18:2 ω 6) y los omega-3 por el ácido alfa-linolénico (ALA; 18:3 ω 3), que son respectivamente los ácidos primarios o generadores de cada familia [77]. Desde un punto de vista bioquímico, ambos tienen 18 átomos de carbono en su cadena acilo presentando dos (LA) o tres (ALA) dobles enlaces carbono-carbono. Desde un punto de vista nutricional, LA y ALA son ácidos grasos “esenciales” para todos los mamíferos. Su condición de “esencialidad” se debe a que son ácidos grasos necesarios para el mantenimiento del estado óptimo de salud pero no pueden ser sintetizados *de novo* por el organismo y, por tanto, deben ser obtenidos a través de la dieta [78].

Una vez ingeridos, estos ácidos grasos pueden ser metabolizados, principalmente por las células hepáticas y dar lugar al resto de miembros de la familia. Así, LA se metaboliza a ácido araquidónico (AA; 20:4 ω 6) y ALA se metaboliza a EPA (20:5 ω 3) y a DHA (22:6 ω 3), incrementando la longitud y el grado de insaturación de su cadena carbonada añadiendo dobles enlaces extra hacia el extremo carboxilo de la molécula del ácido graso [79].

2.2.2. Síntesis *de novo* de los PUFAs en mamíferos

La figura 4 muestra las reacciones metabólicas más relevantes para la transformación de LA y ALA en sus derivados con un número mayor de insaturaciones (AA, EPA y DHA). En este proceso participan principalmente dos enzimas desaturasas (Δ 6-desaturasa y Δ 5-desaturasa) y dos elongasas (ELOVL5 y ELOVL2). Para sintetizar DHA, las células eucariotas necesitan un paso adicional, una β -oxidación parcial que tiene lugar en el peroxisoma [80].

El primer paso en ambas rutas biosintéticas consiste en la inserción de un doble enlace en la posición Δ 6 del LA y del ALA mediante la acción de la Δ 6-desaturasa, que es el enzima limitante de las dos rutas [81]. A continuación, se añaden dos unidades de carbono a la cadena mediante la acción de la elongasa ELOVL5 y se introduce otro doble enlace en la posición Δ 5 mediante la Δ 5-desaturasa para formar AA o EPA, respectivamente. En el siguiente paso, AA y EPA son alargados respectivamente al ácido docosatetraenoico (22:4 ω -6) y al ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 ω -3), mediante la acción de la elongasa ELOVL5 ó 2. A continuación, se produce un alargamiento adicional, llevado a cabo por la elongasa ELOVL2, que da lugar al ácido tetracosatetraenoico (24:4 ω -6) en la ruta de los omega-6 y al ácido tetracosapentaenoico (24:5 ω -3) en la ruta de los omega-3. Estos PUFAs de 24 átomos de

carbono son desaturados de nuevo por la $\Delta 6$ -desaturasa para producir respectivamente el ácido tetracosapentaenoico (24:5 ω -6) y tetracosahexaenoico (24:6 ω -3). Finalmente, estos dos PUFAs son transferidos del retículo endoplasmático a los peroxisomas, donde sufren una β -oxidación parcial que elimina dos unidades de carbono de cada ácido para dar lugar al ácido docosapentaenoico (22:5 ω -6) y al DHA (22:6 ω -3) [6, 76, 79].

Los ácidos grasos formados se incorporan a los triglicéridos (formados por tres ácidos grasos unidos a un esqueleto de glicerol), a los fosfolípidos (dos ácidos grasos sobre un esqueleto de ácido fosfatídico) y a los ésteres de colesterol (un ácido graso fijado al colesterol libre) o se usan para sintetizar mensajeros secundarios tales como los mediadores lipídicos eicosanoides y docosanoides [82].

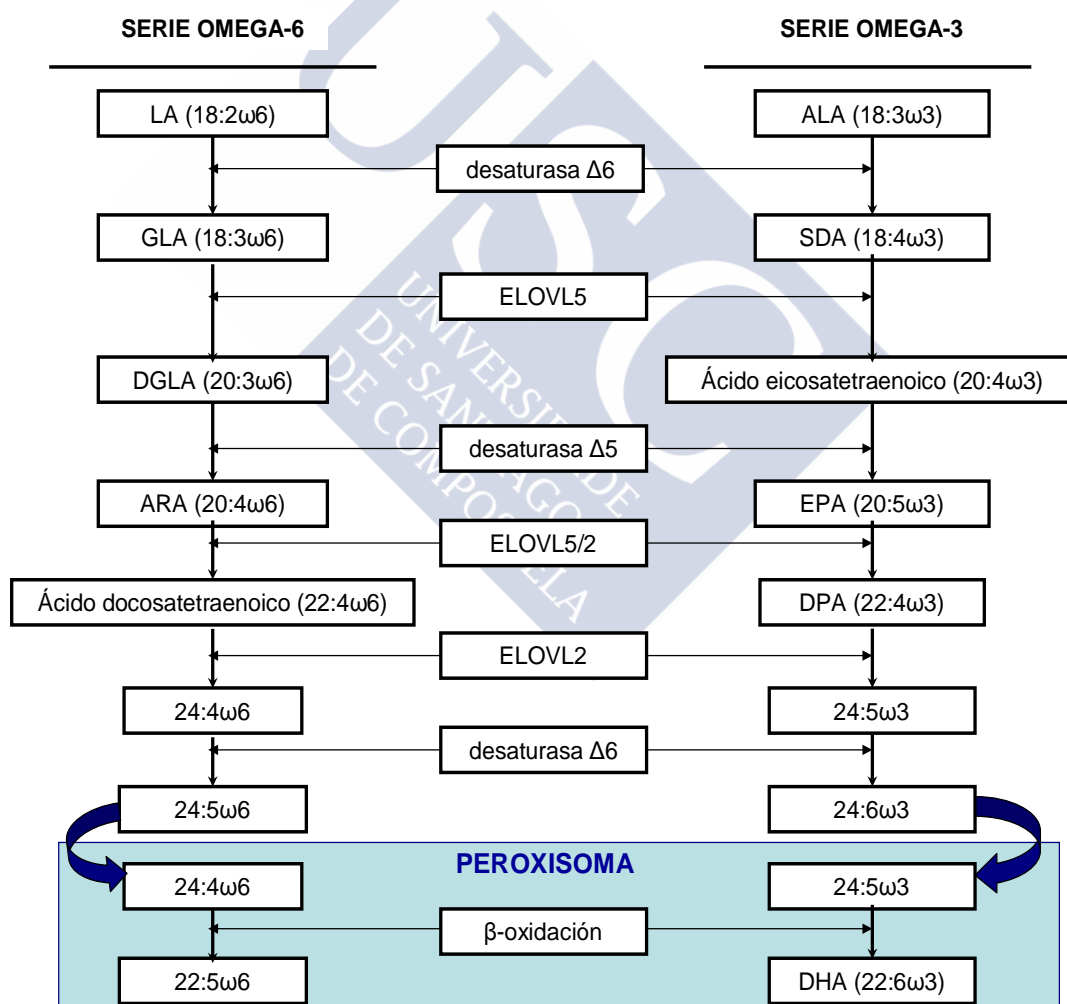


Figura 4. Biosíntesis de los ω -6 y ω -3 PUFAs.

2.2.2.1. Rendimiento de la síntesis *de novo* de EPA y DHA

A pesar de que los mamíferos poseen la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo estos procesos biosintéticos, las tasas de conversión de LA a AA y de ALA a EPA y DHA son muy bajas, en particular en el caso del DHA [6]. En estudios basados en marcadores de isótopos estables, se observó que el rendimiento de transformación de ALA en EPA es de un 0,2% y en DHA del 0,05% [83, 84]. Tampoco es eficiente la conversión de EPA en DHA, ya que se demostró que la suplementación con EPA no incrementa los niveles de DHA en plasma y otros tejidos [85]. Adicionalmente, se observó que el DHA tiene cierta capacidad para retroconvertirse en EPA, de forma que después de una ingesta de DHA, se produce un pequeño aumento de EPA en plasma y en tejidos de humanos y ratas [86].

Las enzimas implicadas en la biosíntesis de estos ácidos tienen preferencia por la serie de los omega-3 [77]. Sin embargo, existen varias razones que pueden explicar la escasa transformación de ALA en DHA. En primer lugar, una gran parte del ALA de la dieta se oxida a acetil-CoA, el cual se recicla en la síntesis *de novo* del colesterol, de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, o se metaboliza a dióxido de carbono [87]. En segundo lugar, es el ácido graso insaturado que se oxida de forma más rápida [88] y en tercer lugar, y a diferencia del LA, la velocidad de acilación del ALA en los lípidos de los tejidos es baja, de manera que su concentración en los fosfolípidos del plasma y de los tejidos es generalmente inferior al 0,5 % del total de ácidos grasos [89]. Probablemente, este bajo contenido de ALA no sea suficiente para competir con el LA por la 6-desaturasa, el enzima limitante de ambas rutas biosintéticas.

Finalmente, hay que tener en cuenta que el metabolismo de los PUFAs depende de la presencia de otros nutrientes en la dieta. En particular, existe una competición entre los ácidos grasos omega-6 y omega-3 por las enzimas biosintéticas, que son las mismas en ambas rutas (Figura 4), de forma que su proporción relativa en la dieta determina la eficiencia de su transformación en el organismo. Así, el consumo excesivo de ácidos grasos de una serie producirá una reducción significativa en la conversión de los ácidos grasos de la otra, que incluso podría conducir a la aparición de deficiencias si no se corrige [6]. Esta situación se produce en la dieta actual de los países desarrollados, que como se ha mencionado en la sección 1 muestra un desequilibrio entre las cantidades de omega-6 y omega-3 en favor de los primeros. También, el aumento de las grasas *trans* en la dieta actual puede incrementar el problema, ya que las grasas *trans* interfieren en los procesos de desaturación y elongación

tanto de LA como ALA, que son ácidos grasos con todos sus dobles enlaces en posición *cis* [8].

Por todo ello, ya que la síntesis *de novo* de EPA y DHA a partir de ALA es apenas eficiente, para alcanzar los niveles adecuados de EPA y DHA en los tejidos, éstos deben ser ingeridos de fuentes dietéticas externas, principalmente de productos marinos.

Asimismo, determinadas condiciones pueden conllevar un aumento de los requerimientos necesarios de EPA y DHA para evitar la aparición de deficiencias. Por ejemplo, los niños prematuros, los individuos hipertensos y algunos diabéticos tienen limitada su habilidad para obtener EPA y DHA de ALA [6]. También hay algunas evidencias de que la desaturasa Δ -6 disminuye con la edad. Estas situaciones especiales deben ser consideradas a la hora de realizar las recomendaciones dietarias.

2.2.3. Principales funciones biológicas de los omega-3 PUFAs

Las dos familias de PUFAs, ω -3 y ω -6, presentan numerosas funciones. Ambas son precursoras de moléculas de señalización con efectos opuestos, modulan la composición de los microdominios de membrana, los mecanismos de señalización mediados por receptores y la expresión génica.

2.2.3.1. Componentes de las membranas celulares

Los ácidos grasos LA, ALA y sus derivados de cadena larga son importantes componentes de las membranas celulares. En concreto, el ARA, el EPA y el DHA son parte esencial de los fosfolípidos de membrana. Además el DHA es uno de los lípidos estructurales más abundantes en el cerebro, la retina, los testículos y el esperma [6].

El tipo y cantidad de PUFAs de la dieta altera el contenido de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de las membranas celulares. El aumento en la ingesta de ácidos grasos de una serie determina su incorporación preferencial a los fosfolípidos, que se produce a expensas de la disminución en el contenido de la otra serie [82].

El enriquecimiento de los fosfolípidos en EPA y DHA altera las propiedades físicas de las membranas biológicas, incrementando significativamente su fluidez, ya que el mayor número de insaturaciones presentes en estos PUFAs con respecto al ARA los convierte en ácidos grasos extremadamente flexibles, con capacidad para cambiar rápidamente sus estados conformacionales [90]. En consecuencia, los PUFAs modulan la actividad de las proteínas

asociadas a la membrana, tales como receptores, canales iónicos y transportadores de iones, alterando las cascadas de señalización intracelular que se inician a nivel de la membrana e influyendo sobre la permeabilidad iónica de la membrana [91].

Los omega-3 PUFAs también modifican la composición de los microdominios de la membrana plasmática conocidos como balsas lipídicas y caveolas. Ambos microdominios son estructuras rígidas presentes en la membrana, formadas por moléculas de colesterol y esfingolípidos altamente empaquetadas. La diferencia básica entre estos microdominios radica en que las caveolas presentan además un elevado contenido en unas proteínas llamadas caveolinas [92]. Las balsas lipídicas y las caveolas funcionan como plataformas de señalización que regulan el transporte de colesterol, las señales de transducción y la endocitosis [93]. Cuando los omega-3 se incorporan a estos microdominios se reduce su contenido en colesterol, esfingomielinina y caveolina, lo que permite en último término la modulación de las rutas de señalización celular [94]. Este fenómeno se ha vinculado con un potencial efecto preventivo de los omega-3 frente al cáncer de colon [95].

Por tanto, la inclusión de omega-3 en las membranas altera sus propiedades físicas, influye en los procesos de señalización celular porque afecta a la función de los receptores de membrana, a los mecanismos de transducción de señales intracelulares y por tanto a la expresión génica, y también al patrón de los mediadores lipídicos producidos, como se explicará a continuación.

2.2.3.2. Precursores de los eicosanoides y docosanoides

Los PUFAs juegan un papel fundamental en la regulación de los procesos inflamatorios. Uno de los mecanismos por los que PUFAs marinos modulan la inflamación es a través de la modificación de los perfiles de mediadores lipídicos implicados en estos procesos.

Omega-3 y omega-6 pueden ser movilizados/re-hidrolizados de los fosfolípidos por la acción de la fosfolipasa A2 (PLA2) [96]. Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, las ciclooxigenasas (COX) y las lipooxigenasas (LOX) pueden convertir ARA y EPA en metabolitos oxidados llamados genéricamente eicosanoides, que es un término derivado del griego eicosa (veinte), indicando los 20 carbonos de la cadena del ARA o del EPA. Las enzimas COX y LOX también pueden metabolizar el DHA, dando lugar en este caso a metabolitos llamados genéricamente docosanoides (derivados de 22 átomos de carbono) [82].

Tal y como se muestra en la figura 5, los eicosanoides derivados del ARA son las prostaglandinas de la serie 2 y los tromboxanos y leucotrienos de la serie 4, que son compuestos altamente inflamatorios. Así, la sobreproducción de este tipo de eicosanoides incrementa la síntesis y producción de citoquinas proinflamatorias, la activación de neutrófilos, la producción de ROS y la permeabilidad vascular. En consecuencia, se incrementa la agregación plaquetaria, la hemorragia y la vasoconstricción [81].

Los eicosanoides derivados del EPA son las prostaglandinas de la serie 3 y los tromboxanos y leucotrienos de la serie 5. Estos eicosanoides son mucho menos activos biológicamente que los derivados del ARA, mostrando un bajo potencial proinflamatorio y pudiendo además antagonizar la acción de éstos [97].

Por otra parte, EPA y DHA son sustratos para la síntesis de un nuevo grupo de mediadores lipídicos conocidos como resolvinas y protectinas, que son antiinflamatorios y promueven la resolución de la inflamación [82]. Las resolvinas de la serie E, derivadas del EPA, y las resolvinas de la serie D, derivadas del DHA, regulan el tráfico y la activación de células que causan la inflamación e inhiben la producción de citoquinas inflamatorias. Finalmente, las protectinas, que derivan específicamente del DHA, tienen un papel afín a las resolvinas en la regulación de la inflamación y además, ejercen una acción específica previniendo el asma, la inflamación de las vías aéreas y la infiltración de las células T en los pulmones [98, 99].

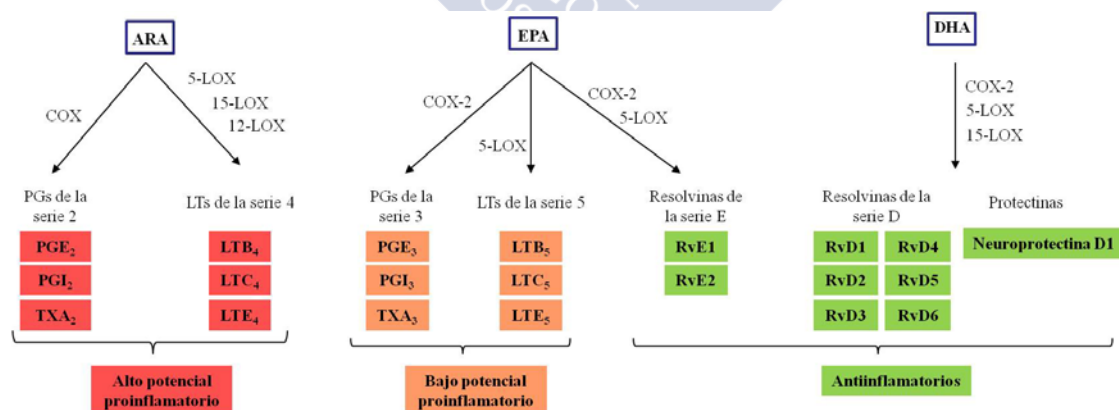


Figura 5. Esquema general de la síntesis y acciones de los mediadores lipídicos derivados del ARA, EPA y DHA. COX: ciclooxygenasa; LOX: lipooxygenasa; LT: leucotrieno; PG: prostaglandina; Rv: resolvina; TX: tromboxano.

2.2.3.3. Reguladores de la expresión génica

Los PUFAs son capaces de regular la expresión génica afectando de manera directa o indirecta a determinados receptores nucleares, que son una familia de factores de transcripción activados por ligandos, que controlan de manera específica la expresión de diversos genes implicados en el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos y en las rutas de señalización de la inflamación [100]. Aunque las dos series de PUFAs son capaces de modular los mismos factores de transcripción, el efecto ejercido por la serie de los omega-3 es más potente, por lo que su capacidad para inducir cambios sobre el metabolismo celular es mayor que la mostrada por los PUFAs de la serie omega-6 [81].

Con respecto a los efectos de los PUFAs sobre los procesos inflamatorios, además de alterar los perfiles de mediadores lipídicos, se ha propuesto que los omega-3 pueden reducir la inflamación a través de la inhibición directa del factor nuclear kappa B (NFκB) [81], un factor de transcripción que induce la producción de moléculas inflamatorias como citoquinas (IL-1, -2, -6, -12, TNF-α), quimoquinas (IL-8, MIP-1α, MCP1), moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, selectina-E) y enzimas como iNOS y COX-2 [101].

El mecanismo específico por el que los omega-3 ejercen su control sobre el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos no ha sido totalmente aclarado. Sin embargo, se ha propuesto un modelo de acción a nivel de la transcripción génica para explicar, al menos en parte, el efecto de los omega-3 sobre dichos metabolismos. Este modelo implica la modulación de factores de transcripción que incluyen al menos a cuatro receptores nucleares (LXR, FXR, HNF-4α y PPAR), a las proteínas de unión al elemento regulador del colesterol o SREBPs y a la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos o ChREBP [102-104].

Las SREBPs funcionan como factores de transcripción que activan específicamente genes implicados en la síntesis de colesterol, la endocitosis de lipoproteínas de baja densidad, la síntesis de ácidos grasos saturados e insaturados y el metabolismo de la glucosa [105]. Existen tres isoformas distintas: SREBP-1a y SREBP-1c, que son codificadas por el mismo gen y SREBP-2, codificada por un gen diferente [106].

Los omega-3 PUFAs disminuyen la abundancia nuclear de SREBPs inhibiendo el procesamiento proteolítico de los precursores de las proteínas SREBPs [107] y regulando la transcripción o el *turnover* del ARNm de la isoforma SREBP-1c [108, 109], que estimula principalmente la transcripción de genes lipogénicos implicados en la síntesis de ácidos

grasos y triglicéridos y que es la isoforma predominante en el hígado de humanos y roedores [110]. Los omega-3 pueden adicionalmente reducir los niveles de SREBP-1c a través de la inhibición del factor LXR, que es el principal activador de SREBP-1c [111]. Asimismo, los omega-3 son antagonistas del HNF-4 α [110]. La actividad de este factor de transcripción está estrechamente regulada por el tipo y cantidad de acil-CoAs de cadena larga presentes en la célula, que se unen con gran afinidad al HNF-4 α . La unión a PUFAs inhibe la actividad transcripcional de este factor, que por el contrario es estimulada por ácidos grasos saturados [112]. De esta forma, los omega-3 PUFAs pueden controlar la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, el metabolismo de las lipoproteínas, la síntesis de ácidos biliares y el metabolismo del hierro [102].

Por otra parte, los omega-3 son agonistas de FXR y PPAR. La activación de FXR mediante su unión directa a omega-3 inhibe la expresión de enzimas implicadas en la síntesis y transporte de ácidos biliares y también contribuye a disminuir los niveles de triglicéridos porque estimula su lavado hepático, inhibe SREBP-1c e induce el PPAR- α [113].

Los omega-3 son ligandos naturales de los PPARs, que tienen múltiples funciones celulares. EPA y DHA son potentes activadores del PPAR- α y su unión a este factor resulta en un cambio rápido en la expresión de los genes implicados en la oxidación de los lípidos. Entre otras funciones, PPAR- α aumenta la oxidación microsomal, peroxisomal y mitocondrial de los ácidos grasos, promueve el catabolismo de los triglicéridos y podría incrementar los niveles de colesterol HDL [110].

Finalmente, los omega-3 inhiben la actividad del ChREBP, un factor que se expresa en respuesta a la glucosa y que induce la transcripción de genes glicolíticos y lipogénicos en el hígado [114]. Esta inhibición se produce porque los omega-3 activan la AMP quinasa, una enzima que fosforila a ChREBP e inhibe así su actividad transcripcional, o bien porque impiden que ChREBP se transloque al núcleo [115].

Adicionalmente, otros factores de transcripción se han sugerido para transmitir las señales de los ácidos grasos al núcleo. Entre ellos, el receptor activado por el ácido cis-retinoico (RXR) y las proteínas de unión a los ácidos grasos (FABPs) o a los acil-CoAs (ACBPs) [103].

El modelo descrito destaca la complejidad por la que los PUFAs ejercen sus efectos pleiotróficos sobre la expresión génica y la necesidad de realizar una mayor labor investigadora que permita descubrir nuevos mecanismos implicados en la respuesta biológica

a los PUFAs. En este sentido, la identificación de nuevas proteínas diana y de rutas bioquímicas alteradas por el efecto de los ácidos grasos de la dieta puede contribuir a entender sus mecanismos de acción y al descubrimiento de nuevas dianas para el tratamiento farmacológico de diversas enfermedades crónicas.

2.2.4. Omega-3 PUFAs y estrés oxidativo

La influencia de los omega-3 sobre la homeostasis redox del cuerpo continúa siendo materia de controversia. La hipótesis de que una ingesta incrementada de omega-3 PUFAs puede aumentar la peroxidación lipídica está basada en la premisa de que la susceptibilidad de los ácidos grasos a la oxidación es directamente dependiente de su grado de insaturación, siendo por ello el DHA el ácido graso más oxidable [116]. Por tanto, se ha descrito que los PUFAs pueden incrementar el índice de insaturación de ácidos grasos, como consecuencia de la incorporación de EPA y DHA a las membranas celulares y a las lipoproteínas, conduciendo a un incremento de la peroxidación lipídica [117].

Esta hipótesis ha sido apoyada por estudios sobre peroxidación lipídica realizados *in vitro* en soluciones homogéneas [118]. Sin embargo, los sistemas vivos son mucho más complejos y están influenciados por factores adicionales que han condicionado que los resultados obtenidos en los estudios *in vivo* sean contradictorios, de forma que algunos de estos estudios encontraron una disminución de los marcadores de estrés oxidativo [119, 120] y otros encontraron un incremento [121, 122] tras el consumo de PUFAs. Esta aparente contradicción puede explicarse por diversos factores entre los que se incluyen la variabilidad en los métodos empleados para valorar el daño oxidativo *in vivo*, la variabilidad en las condiciones experimentales, tales como la cantidad total de PUFAs ingerida, la forma de incluir los PUFAs en la dieta o las proporciones relativas de EPA y DHA, ya que su influencia sobre el estrés oxidativo podría no ser equivalente.

En algunos casos, los efectos protectores de los omega-3 PUFAs frente al desarrollo de alteraciones inflamatorias y cardiovasculares [123] se han vinculado con su potencial antioxidante, principalmente mediante la inducción de enzimas antioxidantes [124], la protección frente al daño oxidativo de las proteínas celulares [125, 126] o la modulación de la señalización redox controlando la producción de radicales libres que actúan como mensajeros secundarios en cascadas de señalización celular [127].

2.2.5. Efectos saludables e ingestas recomendadas de los omega-3 PUFAs

Como consecuencia de sus funciones biológicas, el EPA y el DHA se han propuesto para el tratamiento de diversas enfermedades, aunque sus mecanismos de acción específicos todavía no se conozcan completamente. Algunas de las enfermedades sobre las que el consumo de EPA y DHA puede ejercer sus efectos beneficiosos incluyen enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 1 y 2, obesidad, cáncer, enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario como el lupus, la esclerosis múltiple o la enfermedad de Crohn, enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad como el Alzheimer o el Parkinson, así como enfermedades mentales como la esquizofrenia [7, 96].

En 2010, la FAO (“Food and Agriculture Organization of the United Nations”) publicó un estudio sobre grasas y aceites en la nutrición humana realizado por un panel de expertos de la FAO y la WHO (“World Health Organization”) [128]. En este estudio, el panel de expertos llegó a una serie de conclusiones referentes a los ácidos grasos omega-3 en base a las nuevas evidencias científicas.

El primer lugar, el panel de expertos recomendó un consumo de 0,250 g/día de EPA más DHA para hombres adultos y mujeres adultas que no estén embarazadas o en período de lactancia. También indicaron que deben consumirse ambos ácidos grasos, aunque reconocieron que no existía evidencia suficiente para establecer una ingesta mínima de EPA o DHA por separado. Solamente en el caso de mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, establecieron un consumo mínimo de DHA, de al menos 0,2 g, y elevaron el consumo total de EPA más DHA a 0,3 g/día.

Además, el panel de expertos hizo una referencia al rol que EPA y DHA desempeñan sobre el estrés oxidativo, aunque sus conclusiones fueron un tanto confusas, poniendo de manifiesto la necesidad de profundizar en el estudio de este aspecto de los omega-3 PUFAs. Por un lado, establecieron un consumo diario máximo de EPA y DHA, que debía ser de 2 g al día, en base a la evidencia experimental de que un consumo mayor de omega-3 PUFAs de cadena larga en forma de suplementos podría suponer un incremento en la peroxidación lipídica y reducir la producción de citoquinas. Sin embargo, también reconocieron que niveles más altos de consumo, de hasta 3 g al día, redujeron otro tipo de factores de riesgo cardiovascular sin provocar efectos adversos en ensayos aleatorios realizados a corto y medio plazo.

En la tabla 3, se recogen algunas de las recomendaciones que se han publicado sobre las ingestas recomendadas PUFAs.

Tabla 3. Recomendaciones en el consumo de PUFAs realizadas por distintos organismos internacionales.

Organismo	Año	Población	Recomendación
FAO ("Food and Agriculture Organization of the United Nations") [128]	2010	Población adulta en general	6-11% de la energía diaria en forma de PUFA: 2.5-9% PUFA ω -6 0.5-2% PUFA ω -3 >0.5% de la energía diaria en forma de ALA 0.250-2 g/día de EPA+DHA
WHO ("World Health Organization") [129]	2003	Población adulta en general	6-10% de la energía diaria en forma de PUFA: 5-8% PUFA ω -6 1-2% PUFA ω -3
AHA ("American Heart Association") [130]	2002	Adultos sin ECV*	Comer pescado dos veces/semana
		Adultos con ECV*	1 g/día de EPA+DHA (preferiblemente de aceite de pescado)
		Adultos con triglicéridos elevados	2-4 g/día de EPA+DHA
Workshop "The essentiality of recommended dietary intakes from ω -6 and ω -3 fatty acids" [131]	2000	Población adulta en general	LA: 4.44 g/día/2000Kcal ALA: 2.22 g/día/2000Kcal EPA+DHA: 0.65 g/día/2000Kcal
BNF ("British Nutrition Foundation") [132]	1999	Población adulta (19-50 años)	LA: 1% de la energía diaria EPA+DHA: 1.25 g/día

*ECV: enfermedad cardiovascular

2.3. Polifenoles

Los polifenoles son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, siendo los metabolitos secundarios más abundantes encontrados en las plantas, y constituyen los antioxidantes mayoritarios presentes en la dieta humana [133].

Las principales fuentes dietarias de polifenoles son las frutas y las bebidas procedentes de plantas. Algunas frutas como la manzana, la uva, la pera, la cereza y algunas bayas contienen hasta 200-300 mg de polifenoles por 100 g de peso fresco, mientras que un vaso de vino tinto o una taza de té o café aportan aproximadamente 100 mg de polifenoles [134]. Se han identificado cientos de polifenoles diferentes en los alimentos, siendo los flavonoides y los ácidos fenólicos los dos tipos de compuestos fenólicos más comunes [135].

De entre los alimentos ricos en polifenoles que forman parte de la dieta humana, las uvas y sus productos derivados han suscitado una gran atención y han impulsado el interés de la comunidad científica por estos alimentos antioxidantes, principalmente desde la constatación

de que ciertas poblaciones francesas, caracterizadas por un elevado consumo de grasas saturadas y vino tinto, presentaban una baja prevalencia de enfermedades cardiovasculares, fenómeno que se denominó la “Paradoja Francesa” [136].

Las uvas (*Vitis vinifera L.*) contienen altas concentraciones de polifenoles, especialmente de flavonoides, que incluyen compuestos como flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanones, isoflavonas, proantocianidinas y antocianidinas [137]. En la tabla 4 se resumen la principales características de la composición de la uva y de sus productos derivados.

Tabla 4. Principales características de la composición de las uvas y de los productos derivados ricos en polifenoles (adaptada de la referencia [137])

Producto	Principales polifenoles	Otros componentes
Uvas	Antocianidinas en uvas rojas Flavan-3-oles en uvas blancas	Azúcar (16% de la materia fresca) Fibra dietaria (alrededor del 1% de la materia fresca)
Vino	Flavan-3-oles, flavan-3,4-dioles, antocianinas, flavones, taninos condensados, resveratrol Mayor contenido en el vino tinto que en el blanco	Etanol (3.5-13.5%)
Zumo de uva	Antocianinas en el zumo de uva roja Flavan-3-oles en el zumo de uva blanca Ácido elágico	Azúcar (16%)
Piel	Prodelphinidinas	Fibra dietaria (>75%)
Semillas	Procianidinas	Fibra dietaria (>75%)
Pulpa	Antocianinas Pigmentos derivados de antocianinas	Fibra dietaria (>60%)
Extracto de polifenoles	Antocianidinas-3-glucósidos	Mayoritariamente polifenoles Otros compuestos normalmente no son especificados

Diversos estudios epidemiológicos han asociado el consumo de polifenoles de uva con una reducción del riesgo de padecer diferentes enfermedades [134, 138]. Este efecto beneficioso ha sido atribuido principalmente a su potente capacidad antioxidante, demostrada *in vitro* a través de su habilidad de eliminar radicales libres y de quelar metales [139]. También en estudios *in vitro* realizados en un modelo de digestión intestinal, los polifenoles de uva han demostrado reducir la oxidación de los PUFA's marinos presentes en la dieta, mejorando así su absorción intestinal [140].

2.3.1. Polifenoles en la prevención de enfermedades

Muchos estudios *in vivo* han evaluado el efecto de los polifenoles sobre diferentes parámetros relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En base a estos datos epidemiológicos, se puede concluir que el consumo de polifenoles, y en particular, los presentes en las uvas o en sus productos derivados, muestra los siguientes efectos:

- *Un efecto hipotensivo*, probablemente debido a un incremento en la liberación de NO [141, 142].
- *Un efecto hipolipidémico*, reduciendo los niveles de colesterol total [143], colesterol LDL [144], y triglicéridos [145], ya que parecen incrementar la excreción fecal de estos compuestos. También se ha descrito que pueden reducir los niveles de SREBPs y por tanto, potencialmente, reducir la expresión de enzimas lipogénicos [146].
- *Un efecto antiaterosclerótico* en las primeras etapas del desarrollo de la aterosclerosis, reduciendo la formación de placas de ateroma mediante la inhibición de la proliferación celular en el músculo liso y la oxidación de LDL [147-149].
- *Una mejora del estatus antioxidante* medido en términos de capacidad antioxidante del plasma [150], biomarcadores de oxidación, compuestos y enzimas antioxidantes [151-154]

Adicionalmente, el consumo de polifenoles se ha asociado con la prevención de otras enfermedades humanas, entre las que se incluyen la diabetes, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson [134, 155].

3. ROEDORES COMO MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE ALTERACIONES METABÓLICAS INDUCIDAS POR LA DIETA

3.1. Roedores como modelos animales para el estudio de alteraciones metabólicas inducidas por la dieta

Los roedores, mayoritariamente ratas y ratones, constituyen los modelos animales más utilizados para mimetizar diversas enfermedades humanas, con el objetivo de profundizar en el conocimiento sobre las causas y la progresión de los síntomas de la enfermedad, así como para evaluar la eficacia de potenciales intervenciones terapéuticas.

En particular, se han desarrollado diferentes modelos de roedores que permiten reproducir, en algunos de manera muy precisa, determinadas enfermedades crónicas relacionadas con la dieta, tales como la obesidad, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico [156-159].

El empleo de modelos animales para la investigación en el campo de la nutrición permite ejercer un control preciso de la dieta y de otros factores claves como la actividad física, minimizando la variabilidad de los resultados y permitiendo la comparación de los datos obtenidos entre diferentes laboratorios. La diversidad de modelos animales disponibles, la posibilidad de disponer de controles adecuados así como de realizar técnicas invasivas, como estudios histológicos, prácticamente imposibles de realizar en humanos, son otras de las ventajas que aporta la elección de un modelo animal para llevar a cabo una investigación nutricional dada. Como contrapartida, los modelos animales presentan algunas limitaciones, principalmente derivadas de la necesidad de extrapolar los resultados obtenidos en el modelo animal a la condición humana. Cuando se trabaja con modelos animales, debe considerarse que pueden existir diferencias con respecto al ser humano en los mecanismos de regulación génica, en los procesos patofisiológicos o en la respuesta a determinados medicamentos o drogas, que pueden condicionar que no siempre los resultados obtenidos en el modelo animal se repitan en el ser humano [160, 161].

Los principales modelos de roedores empleados en el estudio de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta pueden clasificarse en dos grupos básicos:

- *Modelos genéticos*
- *Modelos dietarios o inducidos por dietas*

Además, cabe mencionar que algunas investigaciones sobre la diabetes utilizan modelos farmacológicos o inducidos químicamente. En estos casos, se emplean compuestos como la estreptozotocina o el aloxano, que inducen necrosis selectiva de las células beta del páncreas y que son útiles por tanto para generar modelos tanto de diabetes tipo 1 y como de diabetes tipo 2, dependiendo de la dosis empleada [162].

3.2. Modelos genéticos

Los modelos genéticos de roedores más comúnmente empleados en el estudio de patologías como la obesidad, la diabetes tipo 2 o el síndrome metabólico, pueden subdividirse a su vez en dos grupos principales, según tengan funcional o no la ruta de la leptina [158].

La leptina es una hormona peptidérgica de 167 aminoácidos principalmente secretada por adipocitos maduros. El gen de la leptina en ratones, llamado gen ob, se localiza en el cromosoma 6 y fue clonado en 1994 por Zhang y colaboradores [163].

La leptina tiene múltiples funciones en el organismo: regula el tejido adiposo, actúa directamente sobre el hipotálamo, controlando la ingesta de alimentos e incrementando el gasto de energía, y sobre el páncreas, donde inhibe la secreción de insulina y reduce la secreción de glucagón [158, 164, 165]. Incluso se ha descrito que la aplicación crónica de dosis elevadas de leptina induce apoptosis de las células β del páncreas [166].

El otro componente clave en la ruta de señalización de la leptina lo constituyen los receptores de esta hormona. El gen del receptor de leptina en ratones, llamado gen db, fue clonado en 1995 por Tartaglia y colaboradores [167]. Se han identificado cinco variantes fruto del *splicing* alternativo del gen del receptor de la leptina en ratones y seis en ratas [168]. Todas las isoformas del gen pueden subdividirse en dos clases: receptores de forma larga y de forma corta. Ambos tipos de receptores presentan el mismo dominio extracelular para la unión a la leptina, pero tienen dominios intracelulares diferentes. Las formas largas del receptor poseen un dominio intracelular C-terminal funcional, que les permite iniciar la señal de transducción a través de la ruta JAK/STAT [169]. Por su parte, las formas cortas presentan un dominio intracelular más corto o directamente inexistente y su actividad no es del todo conocida, aunque podría participar en el transporte unidireccional de leptina a través de la barrera hematoencefálica [170, 171].

En la Tabla 5 se muestran los modelos genéticos más frecuentemente usados en la investigación de la obesidad, el síndrome metabólico o la diabetes.

Tabla 5. Principales modelos de roedores empleados en la investigación nutricional.

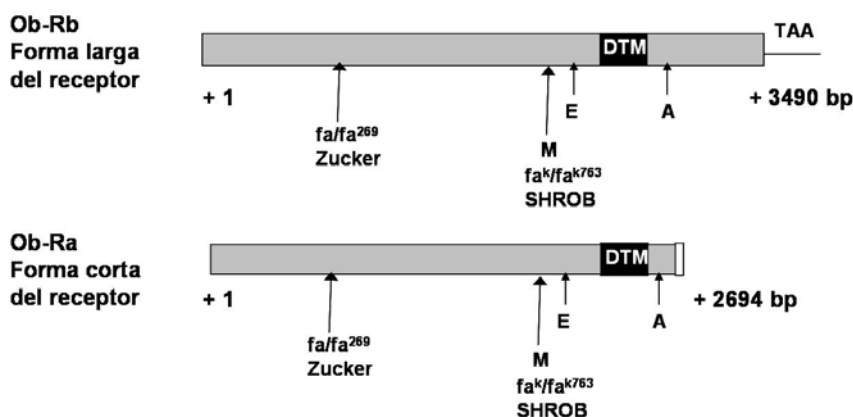
Modelos genéticos con la ruta de la leptina no funcional		Modelos genéticos con la ruta de la leptina funcional	
Ratones	Características	Ratones	Características
Ratones ob/ob (C57BL/6J)	Mutación en el gen de leptina Modelo de, obesidad, síndrome metabólico con diabetes tipo 2 sin hipertensión	Ratones Agouti Yellow	Heterozigotos para la mutación A ^y del gen agouti Modelo de obesidad, síndrome metabólico con hipertensión arterial
Ratones db/db (C57BL/KsJ)	Mutación en el receptor de leptina Modelo de, obesidad, síndrome metabólico con diabetes tipo 2 sin hipertensión	Ratones KK-A ^y	Mutación A ^y introducida en la cepa KK, que es modelo de resistencia a insulina Modelo de obesidad y diabetes
		Ratones MC4-R KO	<i>Knockout</i> para el receptor de melanocortina-4 Modelo de obesidad, síndrome metabólico
		Ratones Tallyho	Origen poligénico Modelo de obesidad
Ratas	Características	Ratas	Características
Ratas SHROB (<i>Spontaneously Hypertensive-Obese</i>)	Mutación en el receptor de la leptina Modelo de obesidad, síndrome metabólico con hipertensión pero sin hiperglucemia en ayunas	Ratas OLETF (<i>Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty</i>)	Origen poligénico Modelo de obesidad, síndrome metabólico con diabetes,
Ratas SHHF (<i>Spontaneously Hypertensive-Heart Failure</i>)	Obtenidas del cruce entre SHROB con una cepa espontáneamente hipertensa Mutación en el receptor de leptina (la misma que SHROB) Modelo de obesidad, síndrome metabólico con hipertensión, diabetes tipo 2 e insuficiencia cardíaca congestiva	Ratas GK (<i>Goto-Kakizaki</i>)	Origen poligénico Ratas no obesas espontáneamente diabéticas Modelo de diabetes tipo 2
Ratas JCR:LA-cp	Misma mutación que SHROB y SHHF Modelo de obesidad, síndrome metabólico Desarrollan espontáneamente lesiones ateroscleróticas a los 20 meses de edad	Ratas Wistar Ottawa Karlsburg W (haplotipo RT1 ^u)	Homocigotas para el haplotipo RT1 ^u del complejo mayor de histocompatibilidad Modelo de síndrome metabólico sin hiperglucemia en ayuno
Ratas Zucker y ratas ZDF (diabéticas Zucker)	Mutación en el receptor del gen de leptina (distinta de la presente en las ratas SHROB) Modelo de obesidad, síndrome metabólico con diabetes tipo 2		

3.2.1. Ratas Koletsky: genéticamente obesas espontáneamente hipertensas (SHROB)

El modelo de rata SHROB (genéticamente obeso, espontáneamente hipertenso), también llamado rata Koletsky, surgió espontáneamente en 1969 [172]. Estas ratas fueron generadas a partir del cruce entre una hembra espontáneamente hipertensa (SHR), obtenida mediante la cría de ratas Wistar-Kyoto que presentaban elevada presión sanguínea, como un macho normotenso Sprague-Dawley. La generación híbrida descendiente fue criada y sólo aquellos animales que presentaban hipertensión (presión sistólica > 150 mmHg) fueron seleccionados como reproductores. Tras varias generaciones, apareció un fenotipo anormal entre los descendientes, caracterizado por una marcada obesidad, evidentemente fruto de una mutación espontánea. Estudios posteriores mostraron que estas ratas obesas no solamente eran hipertensas como sus antecesores delgados, sino que además presentaban otras características fenotípicas que incluían la hiperlipidemia, la hiperinsulinemia y la proteinuria con enfermedad renal [173, 174].

El genotipo obeso afecta a ambos sexos y es un carácter homocigoto recesivo, originalmente designado como f^l y más tarde reclasificado como fa^k [175]. Puesto que tanto los machos como las hembras SHROB son estériles, el genotipo recesivo fa^k/fa^k sólo puede ser obtenido mediante el cruce de dos progenitores heterocigotos y portadores del mismo alelo recesivo (Fa^k/fa^k).

La mutación de obesidad que portan las ratas SHROB (fa^k) es una mutación “nonsense” (sin sentido) en el receptor del gen de la leptina, que resulta en un prematuro codón de parada en el dominio extracelular del receptor de la leptina en la posición +763 (Figura 6) [175]. Como consecuencia, en esta cepa todas las isoformas del receptor de leptina estarán truncadas y carecerán del dominio transmembrana necesario para la señal de transducción de la leptina, provocando que las ratas obesas SHROB sean incapaces de responder ni central ni periféricamente a la señalización mediada por la leptina. Por el contrario, la mutación en el receptor de leptina presente en las ratas obesas Zucker (fa) es en realidad una mutación “missense” (de cambio de sentido) en la posición +269 del dominio extracelular (Figura 6) [174], que disminuye la afinidad del receptor por la leptina y reduce su densidad celular. Por tanto, a pesar de su mutación, las ratas Zucker son capaces de responder a la leptina, si bien su capacidad de respuesta está disminuida.



M: Sitios de mutación de T a A (2289) en la cepa SHROB

E: Sitios de splicing alternativo del mRNA para OB-Re (2389)

A: Sitios de splicing alternativo del mRNA para OB-Ra (2677)

Figura 6. Representación esquemática de la longitud total del ADNc del gen del receptor de leptina en las ratas SHROB *fa^k/fa^k* (+1 to +3490 pares de bases). El gen del receptor de leptina codifica un ARNm que da lugar a una proteína con un único dominio transmembrana (DTM). La mutación sin sentido *fa^k* T→A en la posición +2289 dentro del dominio extracelular se corresponde con el aminoácido 763 de la proteína, mientras que la mutación de pérdida de sentido de las ratas Zucker (*fa/fa*) se corresponde al aminoácido 269. También se muestran los sitios para el splicing alternativo que da lugar a la forma corta del receptor Ob Ra (A) en la posición +2677 y para la forma más corta soluble Ob Re (E) en la posición +2389.

En consecuencia, las ratas SHROB se caracterizan por una obesidad monogénica y una hipertensión espontánea combinadas con la aparición de otras alteraciones fenotípicas como la hiperinsulinemia, la hiperlipidemia y la nefropatía [176]. Por ello, las ratas SHROB constituyen un modelo del síndrome metabólico humano, de acuerdo a sus actualmente aceptados factores definitorios (véase sección 1.3.5.). Además, este modelo es especialmente útil para el estudio de estados prediabéticos, ya que las ratas SHROB presentan hiperinsulinemia pero no hiperglucemia, en contraste con otros modelos animales, como por ejemplo, las ratas Zucker, que desarrollan diabetes tipo 2.

3.3. Modelos inducidos por dietas

El empleo de modelos genéticos es una estrategia efectiva para el estudio de enfermedades humanas asociadas a la dieta, ya que normalmente se consiguen fenotipos de enfermedad severos, distintivos y con poca variabilidad. Sin embargo, puesto que muchos de estos modelos se basan en la alteración de un único gen, la interpretación de los resultados obtenidos con estos modelos debe ser realizada con precaución, ya que podrían no ser del todo representativos de la enfermedad humana asociada a la dieta, considerando que

normalmente estas enfermedades en el ser humano tienen un origen multigénico asociado al incremento de la ingesta calórica y a la reducción de la actividad física.

La alternativa más común al empleo de modelos genéticos la constituyen los modelos inducidos por dieta, que de manera general constituyen modelos de enfermedad más similares al humano. Como contrapartida, la elección de esta estrategia puede conllevar a una mayor dispersión de los datos y dificultar la comparación de los mismos con otros experimentos [177].

Los principales tipos de dieta empleados para inducir obesidad y las patologías asociadas al síndrome metabólico puedan clasificarse en tres grandes grupos: las dietas altas en grasa, las dietas altas en carbohidratos refinados y las dietas altas tanto en grasa como en carbohidratos refinados [31, 156, 157]. Dependiendo de la enfermedad concreta que se pretenda estudiar, puede ser preferible el uso de un tipo u otro de dieta.

3.3.1. Características de las dietas altas en grasa

Mediante el empleo de dietas altas en grasa se han conseguido modelos robustos de obesidad, permitiendo estudiar la conexión entre el aumento de la masa corporal y la cantidad y/o composición de la grasa consumida [156]. Sin embargo, sus efectos sobre otros parámetros como la tolerancia a glucosa, la sensibilidad a insulina y los niveles de triglicéridos en plasma, son mucho más variables y más dependientes de la composición específica de la dieta [178]. Por ello, cuando lo que se pretende es obtener un modelo para el estudio del síndrome metabólico, probablemente no sean las dietas más adecuadas, aunque esto va a depender en gran medida del tipo de dieta alta en grasa que se emplee.

Se han descrito una multitud de dietas altas en grasa, que se diferencian tanto en su contenido relativo en grasa, que puede variar entre el 20 y el 60 % de la energía consumida, como en la composición propia de la grasa [157, 178]. Así se han empleado grasas animales como la mantequilla, la leche o el sebo de vaca, o aceites vegetales como el de maíz, el de girasol o el de coco. Estas variaciones unidas a las diferentes cepas y sexos utilizados explican la diversidad de datos obtenidos y recogidos en la literatura.

3.3.2. Características de las dietas altas en carbohidratos refinados

Mediante el uso de dietas altas en carbohidratos refinados, se han conseguido inducir de manera efectiva trastornos como la resistencia a insulina y la hipertrigliceridemia, por lo que son modelos útiles para el estudio de la diabetes [31]. Sin embargo, sus efectos sobre el aumento de peso son muy variables y de manera general, la inducción de obesidad con este tipo de dietas suele resultar una tarea complicada.

Normalmente, en este tipo de dietas, los carbohidratos refinados suponen entre un 60 y un 70% del aporte calórico, siendo la fructosa y la sacarosa los carbohidratos más comunes [157].

3.3.3. Características de las dietas altas en grasa y carbohidratos refinados

El empleo de dietas altas en grasa y en carbohidratos permite la inducción de un mayor número de alteraciones metabólicas, ya que combina los efectos de ambos componentes, y de manera general, se obtienen buenos modelos de síndrome metabólico [156, 157]. En estos casos, la resistencia a insulina y el incremento de los niveles de triglicéridos se consigue gracias a los niveles elevados de carbohidratos en la dieta, mientras que la obesidad se logra principalmente a través de la dieta alta en grasa. Pero además, los roedores alimentados con este tipo de dietas suelen desarrollar el resto de complicaciones presentes en el síndrome metabólico humano (Figura 7). Este hecho unido a que las dietas altas tanto en grasa como en azúcar son más similares a la dieta humana real, ha llevado a proponer a este modelo inducido como el mejor modelo animal para estudiar el síndrome metabólico humano y para testar preparaciones nutraceuticas y farmacológicas diseñadas para su tratamiento [31].

Normalmente estas dietas se formulan combinando diferentes cantidades de sacarosa y grasa o de fructosa y grasa. El contenido en sacarosa suele variar entre el 10 y el 30% del aporte calórico, mientras que el contenido en grasa oscila entre el 20 y el 40%. Por su parte, el contenido en fructosa suele ser más variable (entre el 10 y el 60%), pudiendo suministrarse con el pienso, en el agua de bebida o en ambos. En consecuencia, el contenido en grasa de estas dietas también es más variable, situándose entre el 20 y el 60% del aporte calórico [159].

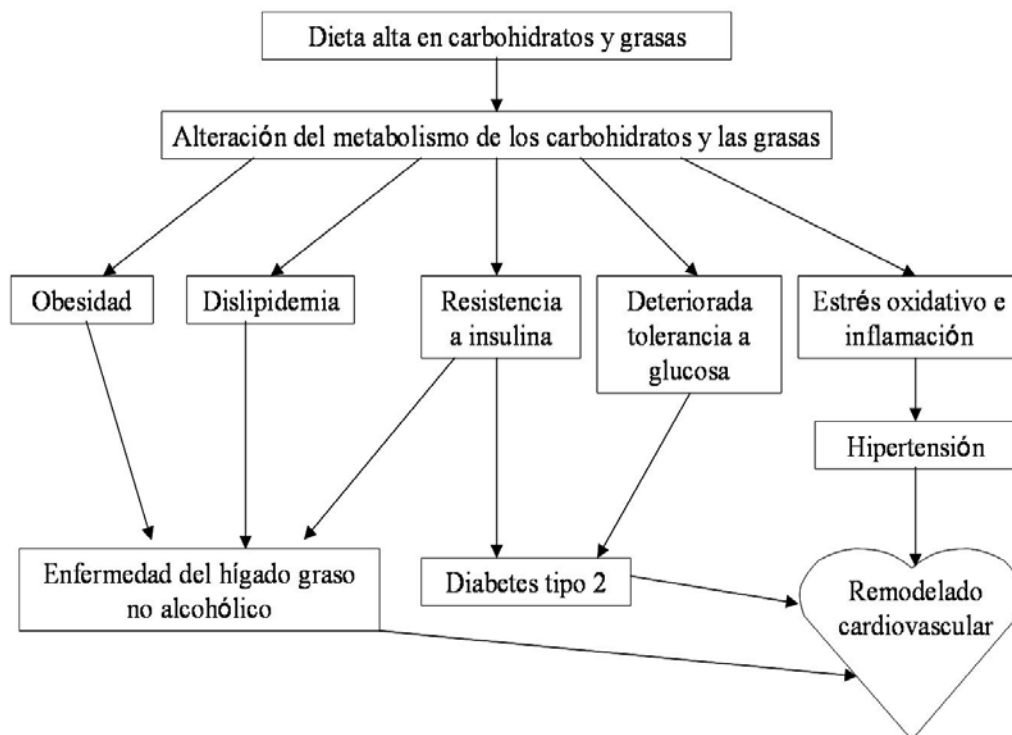


Figura 7. Síndrome Metabólico inducido por una dieta alta en carbohidratos y grasas.



4. METODOLOGÍAS PROTEÓMICAS PARA LA INVESTIGACIÓN NUTRICIONAL

4.1. Ómicas para la investigación nutricional

Prácticamente todos los procesos celulares, desde la expresión génica hasta la síntesis y degradación proteica, pueden ser afectados por la dieta y el estilo de vida, de modo que los nutrientes y otros componentes de los alimentos alteran de forma compleja las funciones metabólicas que tienen lugar en las células.

La complejidad de la relación entre nutrición y salud se traduce en que la investigación en nutrición es, en muchos aspectos, un campo ideal para la aplicación de las aproximaciones de la biología de sistemas [179], un área de la ciencia que abarca a su vez un amplio rango de áreas funcionales denominadas “ómicas”. Estas áreas incluyen la genómica, la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica y la bioinformática [180], conformando un ámbito científico integrador, que se preocupa del estudio de los procesos biológicos utilizando un enfoque colectivo u holístico.

De la aplicación de este enfoque a la nutrición, ha surgido el concepto de biología de sistemas nutricional y las disciplinas en las que se apoya, las llamadas nutri-“ómicas”. Así, el estudio de la interacción de los nutrientes y otros componentes de la dieta con el genoma de una persona, o con los niveles de transcripción génica, o con los niveles o las modificaciones de las proteínas, o con la producción de metabolitos pueden ser respectivamente llamados nutrigenómica, nutritranscriptómica, nutriproteómica y nutrimetabolómica [181].

4.1.1. Proteómica y nutriproteómica

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas y por tanto comprende las metodologías utilizadas para el estudio de un proteoma [182]. El término de “proteoma”, inicialmente introducido por Wilkins y col., hace referencia al “conjunto de proteínas codificadas por un genoma”, que incluye no sólo todas las proteínas de una célula, tejido, orgánulo, etc. sino también todas sus isoformas y modificaciones (todas las especies proteicas) [183, 184].

Una vez establecido el concepto de proteómica, se puede definir el concepto de nutriproteómica o proteómica nutricional, basado en la aplicación de las metodologías proteómicas a la investigación relacionada con la nutrición, incluyendo el estudio de la

interacción de los ingredientes bioactivos de los alimentos con las proteínas [185]. La nutripoteómica se ocupa del análisis a gran escala de la estructura y función de las proteínas y de las interacciones proteína-proteína que tienen lugar en una célula para identificar la dianas moleculares de los componentes de la dieta [186]. Dicho análisis engloba la determinación de cómo los componentes de la dieta interaccionan con las proteínas, influyendo sobre su síntesis o degradación, afectando a la formación de modificaciones postraduccionales (irreversibles o no) en las proteínas o las interacciones con moléculas de pequeño tamaño. También abordará el estudio de las consecuencias de dichas interacciones.

La consecución de los objetivos planteados por la proteómica nutricional requiere el uso de diferentes sub-disciplinas proteómicas. Entre ellas, se encuentran las estrategias de la proteómica redox y de la proteómica cuantitativa, que serán las herramientas principales empleadas en esta tesis doctoral.

4.2. Proteómica redox

Entre la diferentes biomoléculas, las proteínas son las principales dianas de las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (ROS/RNS), pudiendo eliminarse entre el 50-75% de las RS generadas [187]. Se han identificado numerosas modificaciones postraduccionales (PTMs) consecuencia de la actividad de ROS/RNS, que pueden conducir al cambio en la estructura y/o en la función de las proteínas oxidadas, siendo determinantes en una enorme variedad de procesos celulares y probablemente en el desarrollo y progresión de enfermedades [19, 188-190]. Dada su relevancia, el interés de la comunidad científica por el estudio de las modificaciones oxidativas de las proteínas ha aumentado espectacularmente en los últimos años, impulsado en gran medida por el enorme avance en las técnicas analíticas de alto rendimiento, especialmente, en el campo de la espectrometría de masas (MS).

Como consecuencia, ha emergido una nueva área dentro de la proteómica que ha sido llamada “proteómica redox”, que se centra en la identificación y cuantificación de los cambios en el “proteoma redox”, entendiendo por proteoma redox al conjunto de los componentes del proteoma que sufren tanto reacciones redox reversibles como modificaciones irreversibles causadas por las especies reactivas durante el estrés oxidativo [188, 191]. En conjunto, la proteómica redox engloba tanto el estudio de la señalización redox como del daño oxidativo de las proteínas.

Las PTMs oxidativas y nitrosativas pueden dividirse en dos tipos: reversibles e irreversibles (Figura 8):

Modificaciones reversibles. Las proteínas son las únicas macromoléculas biológicas que contienen elementos, concretamente los aminoácidos de cisteína, metionina y seleno-cisteína, que pueden sufrir reacciones redox reversibles [189]. La función de este tipo de reacciones es dual; en primer lugar, participar en las primeras etapas de la respuesta celular al estrés oxidativo protegiendo a las proteínas frente al daño irreversible [192]. En segundo lugar, permitir la regulación dinámica de la actividad y la estructura de polipéptidos, función crucial en las proteínas implicadas en la señalización redox [193]. La formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína es un ejemplo de este tipo de modificación reversible.

Modificaciones irreversibles. En condiciones patofisiológicas, las proteínas sufren daño oxidativo o nitrosativo irreversible que repercute en su actividad o degradación y finalmente en el funcionamiento celular [194]. Entre las PTMs irreversibles están la carbonilación y la nitración proteica.

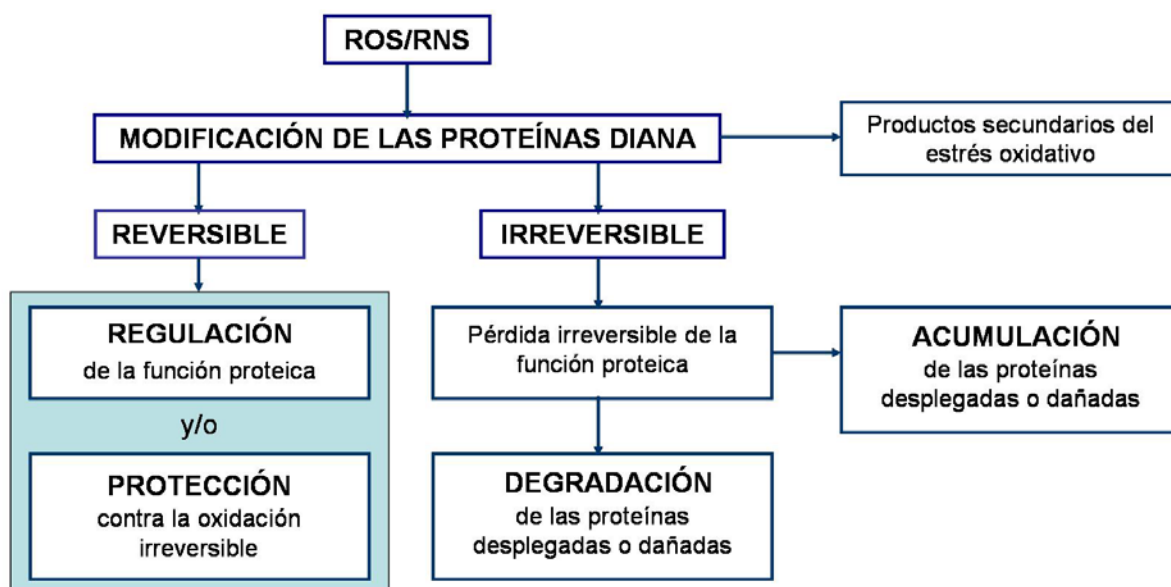


Figura 8. Consecuencias del ataque de ROS o RNS sobre la función proteica. Las especies reactivas (ROS o RNS) pueden causar modificaciones oxidativas sobre proteínas diana sensibles. Las modificaciones reversibles, normalmente en residuos de cisteína y metionina, pueden tener un papel dual de modulación de la función proteica y de protección frente a la modificación irreversible. Las modificaciones irreversibles pueden asociarse con la pérdida permanente de la función proteica y pueden conducir o bien a la degradación de la molécula dañada por el sistema proteasomal y otras proteasas, o a su acumulación progresiva.

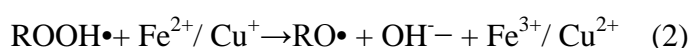
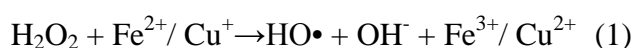
4.2.1. Carbonilación proteica

La carbonilación de las proteínas se define generalmente como una modificación oxidativa postraducciona irreversible causada por el ataque de ROS, que resulta en la introducción de un grupo carbonilo en la cadena polipeptídica de la molécula [19]. Se considera el biomarcador más general y adecuado para evaluar el daño proteico oxidativo asociado con varias alteraciones y enfermedades humanas [195], ya que el número de grupos carbonilo observado en una proteína se correlaciona satisfactoriamente con el daño proteico causado por el estrés oxidativo [196].

El proceso de carbonilación proteica supone la introducción de grupos carbonilo dentro de la estructura de las proteínas. La introducción de estos grupos puede producirse mediante diferentes mecanismos, principalmente por oxidación producida por el ataque directo de ROS, por conjugación con productos de peroxidación lipídica o por glicación/glicoxidación [197].

Diferentes tipos de ROS pueden atacar directamente las proteínas, siendo el radical HO• la especie más oxidante. Este radical se forma por radiolisis de las moléculas de agua o mediante la reacción de Fenton, que da lugar a la oxidación catalizada por metal (MCO) de las proteínas [198]. En condiciones normales, la MCO constituye el mecanismo más común de carbonilación proteica en los organismos vivos.

Normalmente, la MCO se produce cuando iones metálicos como Fe²⁺ o Cu⁺ interactúan con peróxidos como el H₂O₂ y alquilperóxidos a través de la mencionada reacción de Fenton, dando lugar a la formación de radicales hidroxilo (reacción 1) o alcoxilo (reacción 2). El elevado potencial de reducción (E°= 2.31V) del radical HO• le confiere capacidad para oxidar prácticamente cualquier molécula de interés biológico debido al menor potencial de reducción y potencialmente, casi todos los aminoácidos de las proteínas pueden ser indiscriminadamente oxidados por los radicales HO• [199].



Como se muestra en la figura 9, el ataque directo de ROS a las proteínas conduce a dos mecanismos de carbonilación proteica. El primer mecanismo implica la ruptura oxidativa del esqueleto proteico bien por la vía de la α-amidación (Figura 9A) o bien mediante la oxidación

de un residuo de glutamilo (Figura 9B), que conduce a la fragmentación de la cadena polipeptídica [198]. El segundo mecanismo implica la oxidación directa de las cadenas laterales de aminoácidos de la proteína, principalmente de la prolina, la arginina, la lisina y la treonina dando lugar a la formación de carbonilos derivados como 2-pirrolidona (derivado de la prolina), semialdehído glutámico (derivado de la arginina y la prolina), semialdehído α -aminoadípico (derivado de la lisina) y ácido 2-amino-3-cetobutírico (derivado de la treonina) (Figura 9C) [189]. Otros aminoácidos como el triptófano pueden oxidarse dando lugar a compuestos como la kinurenina o la N-formil kinurenina, aunque dicha oxidación todavía no ha sido muy estudiada en el contexto de la carbonilación proteica [200].



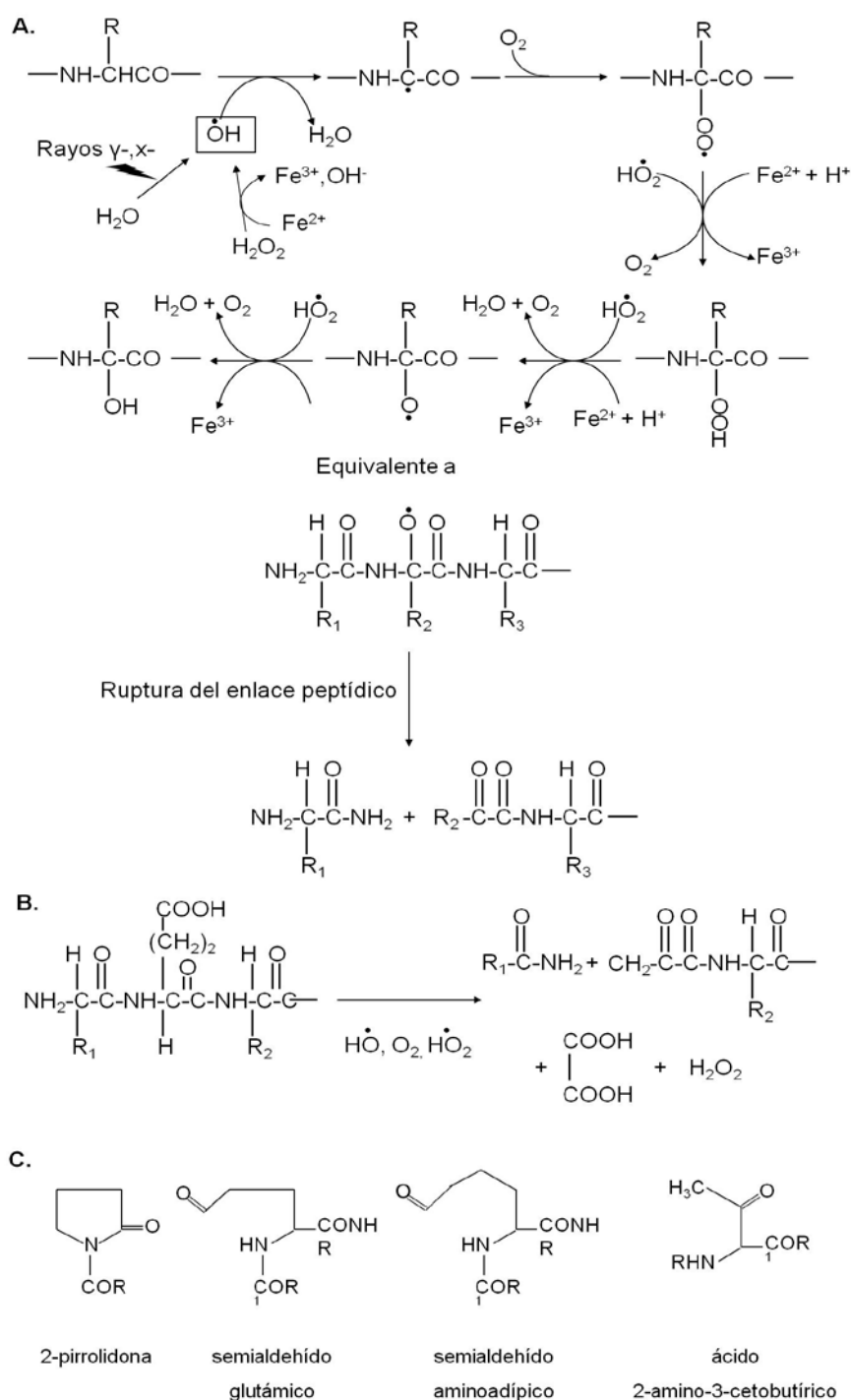


Figura 9. Mecanismos de carbonilación proteica inducida por el ataque directo de ROS. A. La carbonilación proteica puede ocurrir por la ruptura oxidativa del esqueleto proteico a través de la vía de la α -amidación o la oxidación de residuos glutamilo. B. También se puede producir por oxidación directa de la prolina, la arginina, la lisina y la treonina, dando lugar a la formación de carbonilos como (C) la 2-pirrolidona (derivado de la prolina), el semialdeído glutámico (derivado de la lisina y la prolina), el semialdeído α -aminoadípico (derivado de la lisina) y el ácido 2-amino-3-cetobutírico (derivado de la treonina).

La conjugación con productos resultantes de la peroxidación lipídica constituye otro mecanismo importante de formación de carbonilos en las proteínas. Estos compuestos generados durante la oxidación de los PUFAs, entre los que se incluyen aldehídos o cetonas como 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), acroleína, malondialdehído (MDA), 4-hidroxi trans-2,3-hexenal (4-HHE), 2-propenal o 4-oxo-trans-2,3-nonenal (4-ONE), son fuertemente electrofílicos y reaccionan rápidamente con los grupos nucleofílicos de las proteínas, sobre todo con los residuos de lisina, cisteína e histidina, formando predominantemente bases de Schiff o aductos de Michael [200, 201]. Como resultado de estas reacciones se generan los llamados productos finales de lipoxidación avanzada (ALEs, de sus siglas en inglés), que conservan el grupo carbonilo dentro de la estructura proteica.

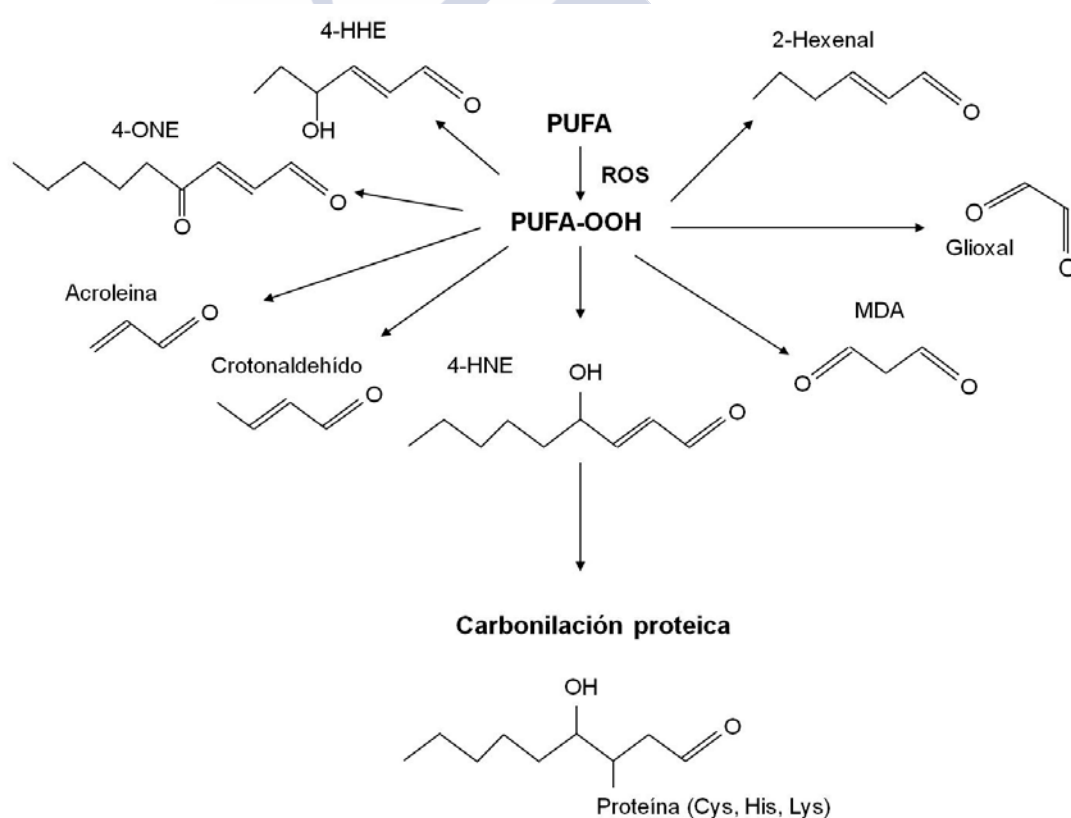


Figura 10. Estructura química de los aldehídos reactivos generados por la peroxidación lipídica de los PUFAs, que incluyen aldehídos α,β -insaturados como 4-HNE, 4-ONE, 4-HHE, 2-hexenal, crotonaldehído y acroleína y dialdehídos como glioxal y malondialdehído (MDA). A modo de ejemplo, se muestra la carbonilación de los residuos de Cys, Lys o His de las proteínas por su unión a 4-HNE.

Finalmente, la carbonilación proteica también puede ocurrir vía glicación. El proceso de glicación, o glicosidación no enzimática, implica múltiples reacciones oxidativas y no oxidativas, colectivamente llamadas reacciones de Maillard, por las que se produce la reacción de azúcares reductores, como la glucosa o la fructosa, o sus derivados oxidados, como glucolaldehído, metilglioxal y glioxal, con residuos de lisina o arginina de las proteínas, que finalmente conducen a la generación de productos terminales avanzados de glicación (AGEs) sobre las proteínas [202].

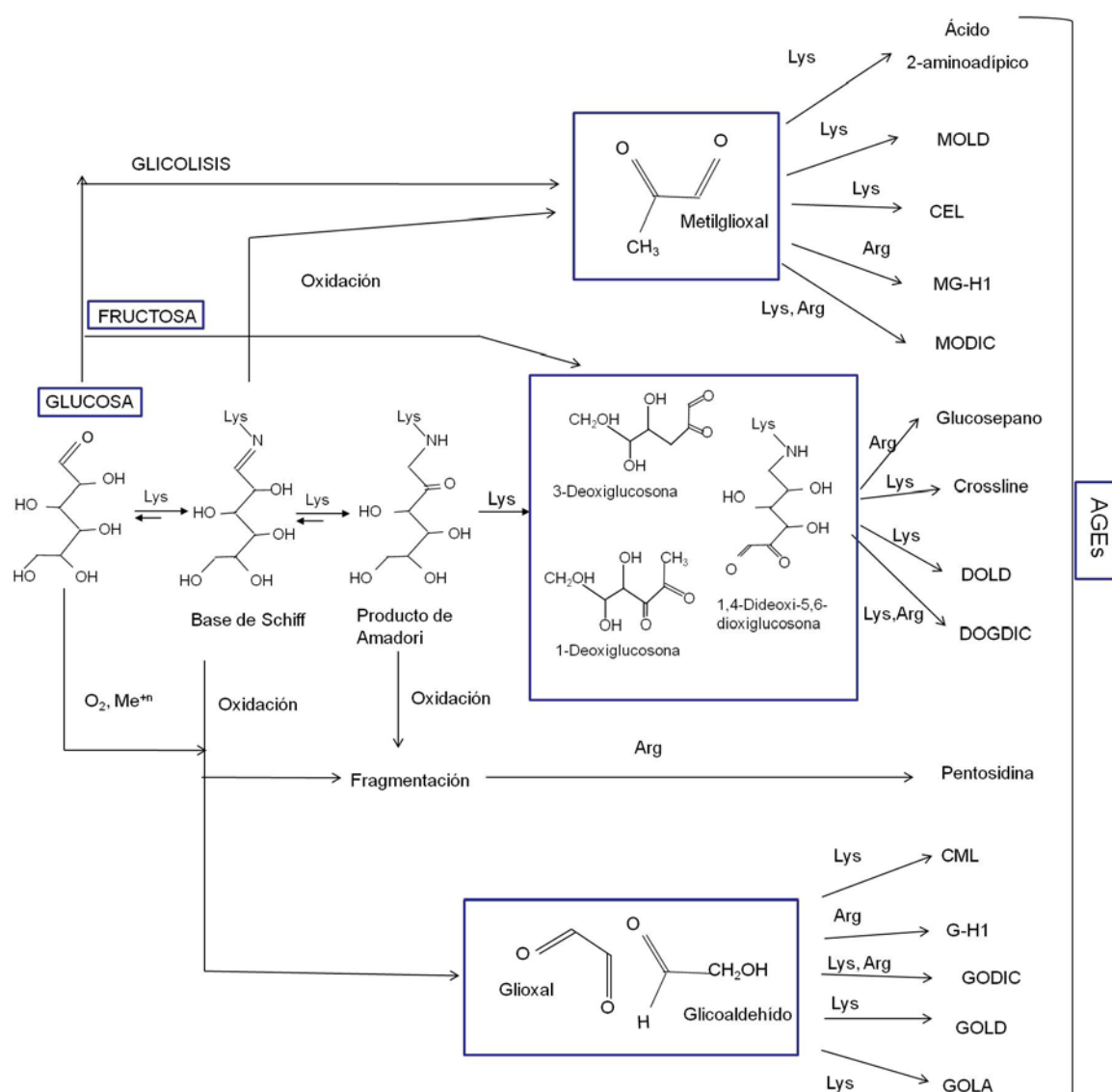


Figura 11. Mecanismos que conducen a la formación de AGEs a partir de la glucosa o la fructosa o sus intermediarios oxidados. CEL: carboxietil-lisina, CML: carboximetil-lisina; DOGDIC: producto de entrecruzamiento imidazol derivado de 3-deoxiglucosona; DOLD: dímero 3-deoxiglucosona-lisina; GODIC: producto de entrecruzamiento imidazol derivado del glioxal; GOLD: dímero glioxal-lisina; MODIC: producto de entrecruzamiento imidazol derivado del metilglioxal; MOLD: dímero metilglioxal-lisina.

4.2.2. Consecuencias biológicas de la carbonilación de proteínas

Numerosos estudios recogidos en la bibliografía han asociado la carbonilación proteica con la etiología y/o la progresión de diversas enfermedades humanas así como con el proceso de natural de envejecimiento [195, 203]. Aunque el papel exacto que juegan las proteínas carboniladas en estos procesos se desconoce en muchos casos, se considera que la carbonilación proteica es un marcador de daño oxidativo ya que puede produce inducir cambios conformacionales y provocar el desplegamiento de las proteínas celulares, modificaciones que afectan a su función biológica y que normalmente conducen a la inactivación total o parcial de las proteínas oxidadas [195, 204]. Asimismo, el fenómeno de carbonilación proteica puede conllevar una amplificación del estrés oxidativo celular, ya que el evento inicial de carbonilación conduce a la generación de nuevas especies reactivas que pueden iniciar reacciones oxidativas en cadena e incrementar el daño oxidativo [205].

Pero además, puesto que la carbonilación es una modificación oxidativa esencialmente irreversible, las proteínas carboniladas no pueden ser reparadas y deberán ser eliminadas, generalmente por las actividades de degradación del proteasoma [206]. Sin embargo, la capacidad de las células para eliminar proteínas carboniladas es limitada, particularmente porque el proteasoma puede ser también inactivado oxidativamente en condiciones de estrés oxidativo [207]. Cuando este sistema de degradación falla, las proteínas carboniladas se acumulan en las células promoviendo la formación de lo que se conoce como “agregados” proteicos [208]. Pero incluso aunque la actividad del proteasoma no esté oxidativamente disminuía, pequeños niveles de proteínas dañadas pueden escapar de la degradación y acabar formando estos agregados de gran masa molecular, que se van acumulando durante el envejecimiento [209].

Agregados proteicos. La acumulación de proteínas carboniladas “no degradadas” favorece la formación de entrecruzamientos intra- o inter- moleculares entre las proteínas, principalmente a través de los siguientes mecanismos [210]:

- a) la formación de puentes disulfuro entre las proteínas a través de la oxidación de la cisteína
- b) la formación de una base de Schiff entre un grupo carbonilo formado en la cadena lateral de un aminoácido de una proteína y un residuo de lisina de otra

c) la formación de una base de Schiff entre el grupo carbonilo de un ALE presente en una proteína y un residuo de lisina de otra

d) la formación de una base de Schiff entre un grupo carbonilo de un AGE presente en una proteína y un residuo de lisina de otra

e) mediante el entrecruzamiento de radicales libres centrados en el carbono

La consecuencia de estos entrecruzamientos es la formación de estructuras oligoméricas de proteínas desplegadas o mal plegadas que no deberían unirse en condiciones normales, conocidas como agregados proteicos, aunque también son llamados cuerpos de inclusión, placas, agregosomas, gránulos de lipofusina o ceroides [211]. Estos agregados son esencialmente insolubles y metabólicamente estables en condiciones fisiológicas normales, ya que no pueden ser eliminados por los mecanismos de degradación proteica [212]. Además, la formación de agregados inhibe la actividad del proteasoma [213, 214], conduciendo a una disminución de los procesos proteolíticos celulares, que puede incrementar a su vez la acumulación de proteínas oxidadas.

Los agregados proteicos son tóxicos y se han asociado estrechamente con la aparición y la progresión de enfermedades como la diabetes o numerosas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson [215].

4.2.2.1. Papel de la carbonilación proteica en la señalización celular

Más allá del papel de la carbonilación en el daño proteico, recientemente se ha especulado que la carbonilación proteica puede regular procesos de señalización celular, bien mediante la activación de sistemas de señalización o bien ejerciendo como mensajeros secundarios.

Un ejemplo de cómo la carbonilación puede activar rutas de señalización puede ser la ruta del factor nuclear derivado del eritroide 2 (NRF2) y la proteína asociada a ECH tipo Kelch 1 (KEAP1), que controlan la expresión de genes implicados en la respuesta antioxidante. Así, la carbonilación específica de los grupos tiol presentes presentes en Cys273 y Cys288 de KEAP1 provoca la ruptura de la unión entre KEAP1 y NRF2. La liberación de NRF2 permite su translocación al núcleo, donde se dimerizará con otros factores de transcripción nucleares, permitiendo en último término la expresión de los genes que participan en la respuesta antioxidante [190].

También se ha postulado que péptidos carbonilados derivados de la degradación proteolítica de proteínas oxidadas podrían actuar como mensajeros secundarios específicos en cascadas de señalización iniciadas por ROS, en concreto por H_2O_2 , en orgánulos celulares como las mitocondrias o los cloroplastos [198]. Incluso se ha planteado que algunas especies de proteínas carboniladas podrían jugar un papel activo en la señalización redox de la célula, lo que implicaría un mecanismo de decarbonilación que todavía se desconoce [189]. Se ha hipotetizado que este mecanismo de decarbonilación puede estar mediado por la reducción de los grupos carbonilos por tioles biológicos [216] o mediante la oxidación de los carbonilos a ácido carboxílico, que eliminaría la capacidad de éstos para reaccionar con los grupos hidrazida de los compuestos derivatizantes empleados en su detección que se resumirán a continuación [217].

4.2.3. Metodologías para el análisis de la carbonilación proteica

El método clásico para la cuantificación de los niveles de carbonilación proteica presentes en una muestra consiste en la realización de un test colorimétrico basado en el marcaje con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). El DNPH es un compuesto que contiene un grupo hidrazida ($-NHNH_2$) capaz de unirse covalentemente con los grupos carbonilo para dar lugar a hidrazonas estables, donde grupo dinitrifenilo (DNP) puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico con una absorbancia máxima a 365-375 nm [218].

Este test pionero desarrollado por Levine y Stadtman [219] continúa siendo hoy en día el método más comúnmente empleado para la determinación de los niveles generales de oxidación proteica en numerosos estudios. La introducción posterior de anticuerpos anti-DNP incrementó de manera significativa la sensibilidad del método analítico, puesto que la aplicación de metodologías inmunoquímicas, como la técnica de ELISA (acrónimo del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) [220-222], permitió cuantificar los niveles de carbonilación proteica en muestras extremadamente poco concentradas. Quizás la mayor desventaja de estos métodos clásicos estriba en que no ofrecen información acerca de la identidad de las proteínas carboniladas ni de su nivel individual de carbonilación.

El creciente interés por entender el papel de la carbonilación proteica en el metabolismo celular y su vínculo con los procesos patofisiológicos, ha impulsado el desarrollo de estrategias proteómicas que permitan la identificación y cuantificación específica de las proteínas carboniladas presentes en una muestra biológica dada. Un aspecto importante a

tener cuenta en este tipo de estudios es que, normalmente, sólo una pequeña fracción de las proteínas presentes en los fluidos o tejidos biológicos estará carbonilada. Para resolver este problema, las estrategias proteómicas desarrolladas incluyen un paso previo de aislamiento y/o enriquecimiento de las proteínas carboniladas, que puede implicar o no la realización de geles de electroforesis determinado así su clasificación como métodos proteómicos basados en gel o métodos libres de gel [223].

En cualquier caso, puesto que los carbonilos de las proteínas no son distinguibles espectrofotométricamente por sus propiedades de absorbancia o de fluorescencia, la mayoría de aproximaciones proteómicas para detectar, identificar y cuantificar las proteínas carboniladas requieren el empleo de sondas químicas de marcaje [224]. Se han empleado diferentes sondas químicas para la detección de los carbonilos proteicos incluyendo la ya mencionada DNPH, el sodio [^3H]-borohidrido, sondas que contienen biotina hidrazida y sondas fluorescentes como la hidroxilamina fluorescente o la fluoresceína-5-tiosemicarbazida.

4.2.3.1. Determinaciones basadas en gel

Tradicionalmente, la electroforesis bidimensional (2-DE) [225, 226] ha sido la plataforma principalmente empleada para la separación y visualización de las proteínas carboniladas presentes en muestras complejas, como paso previo a su análisis por espectrometría de masas.

La 2-DE se basa en una primera separación de las proteínas en función de su punto isoelectrico (pI), que se correspondería con la “primera dimensión”, seguida de una segunda separación en función de la masa molecular de la proteína (M_r), denominada “segunda dimensión”. Por tanto, la realización de 2-DE lleva implícito la combinación de dos técnicas electroforéticas: un isoelectroenfoque (IEF) [227] y la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) [228].

Quizás el método mayoritariamente usado para determinar carbonilación proteica en los experimentos basados en gel es el que emplea la derivatización con DNPH. Las proteínas carboniladas derivatizadas con DNPH se resuelven en geles de electroforesis y la carbonilación asociada a bandas o spots específicos se detecta mediante experimentos de Western blot usando anticuerpos anti-DNP [229]. Incluso, existe un kit comercial para realizar este análisis, que recibe el nombre de OxiblotTM (Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA). Sin embargo, el uso de los kits comerciales de DNPH puede conducir a una sobreestimación del contenido en carbonilos de las proteínas, ya que el protocolo comercial

recomienda una alta concentración de tioles en el tampón de homogeneización que podría provocar la duplicación de los grupos carbonilo en las proteínas mediante reacciones de Fenton estimuladas por estos grupos tiol [230]. Adicionalmente, algunos autores cuestionan la estabilidad de la 2,4-dinitrofenilhidrazona en condiciones alcalinas o durante el almacenamiento [189].

Otro inconveniente de este método es que requiere la realización de geles paralelos, uno en el que se resuelven las proteínas tratadas con DNPH para su detección por Western blot, y otro en el que se resuelven las proteínas no tratadas para su identificación por MS, lo que no solamente alarga el tiempo experimental sino que dificulta la correspondencia de los spots/bandas de proteínas entre los dos geles (Figura 12B). Este problema se ve agravado por el hecho de que la derivatización con DNPH modifica el punto isoeléctrico de las proteínas, lo que podría evitarse realizando la derivatización después del isoelectroenfoque [231].

Una buena alternativa al DNPH en los experimentos basados en gel es la utilización de sondas fluorescentes de luz visible como la fluoresceína-5-tiosemicarbazida (FTSC), que fue inicialmente introducida por Ahn y colaboradores para la medida de los carbonilos proteicos [232]. Esta sonda, al igual que el DNPH, contiene un grupo hidrazida capaz de reaccionar específicamente con los carbonilos de las proteínas mediante la formación de una base de Schiff, la cual puede ser estabilizada empleando un agente reductor [232, 233].

En comparación con el DNPH, las propiedades de fluorescencia de la FTSC proporcionan al menos dos ventajas en los análisis basados en gel. Primero, eliminan la necesidad de realizar geles paralelos puesto que la detección de las proteínas carboniladas no se produce mediante experimentos de Western blot, simplemente se pueden detectar empleando un transiluminador UV equipado con un filtro de emisión adecuado (a 520 nm), disminuyendo de forma significativa el tiempo experimental. Segundo, reducen los errores asociados con la identificación del spot/banda en el gel y su excisión para el posterior análisis por MS, puesto que la visualización de las proteínas totales y las proteínas carboniladas se realiza sobre el mismo gel (Figura 12A). Por tanto en los sistemas basados en gel, la elección de una sonda fluorescente como FTSC podría ser preferible a la derivatización con DNPH [224].

Combinando la metodología de la electroforesis bidimensional con las sondas específicas para marcar los carbonilos no sólo se pueden aislar e identificar las proteínas carboniladas, también se puede cuantificar el grado de carbonilación de cada proteína en relación con su cantidad general, mediante la comparación de la intensidad del gel de carbonilación con la

intensidad del gel teñido con colorantes de proteínas (Coomassie Brilliant blue, SyproRuby, tinción con plata, etc) que se corresponde con la cantidad total de proteína presente. Esto permite la normalización de la señal de carbonilo respecto a la cantidad de proteína. Debe tenerse en cuenta que como en cualquier análisis proteómico, el estudio de las proteínas carboniladas está sesgado a favor de aquellas proteínas más abundantes. Por tanto, la determinación del nivel de carbonilación relativo de una determinada proteína es más informativo que el contenido total de proteína modificada. De lo contrario, aquellas proteínas abundantes pero con bajo contenido de carbonilos específicos pueden aparecer como predominantes en los geles que muestran las proteínas carboniladas, mientras que proteínas poco abundantes pero con niveles altos de carbonilación específica podrían pasar desapercibidas [234].

Aunque las estrategias basadas en gel continúan siendo las más utilizadas para el análisis de la carbonilación proteica [198], presentan algunas limitaciones específicas, inherentes a la metodología 2-DE.

La separación 2-DE por sí misma no permite generalmente la resolución de proteínas con masas moleculares superiores a 150 kDa o inferiores a 10 kDa, proteínas muy hidrofóbicas o con puntos isoelectricos extremos (<2 o >10), con lo cual se limita la cobertura proteómica en la mayoría de muestras biológicas [235, 236]. Tampoco las proteínas que están presentes en concentraciones muy bajas en las muestras, puesto que los métodos de detección no permiten profundizar más de cinco órdenes de magnitud desde la tinción con Coomassie hasta el marcaje radiactivo. Todo ello hace que alrededor de un 20% del proteoma no pueda ser analizado de forma rutinaria por 2-DE [237]. Además, es una técnica laboriosa, que consume bastante tiempo y difícil de automatizar [238].

4.2.3.2. Determinaciones libres de gel

En el caso de los experimentos proteómicos libres de gel, la principal sonda química utilizada para el marcaje de los carbonilos es la biotina hidrazida (BHZ), seguida de DNPH y O-(biotinilcarbazoilmetil) hidroxilamina (ARP) [239], pero también pueden emplearse otras como el reactivo P de Girard, O-ECAT, HICAT, etc [240]. Por su parte, el enriquecimiento de las proteínas carboniladas en estos sistemas libres de gel suele realizarse mediante cromatografía de afinidad con avidina, cromatografía de intercambio catiónico o fase reversa [189].

El protocolo clásico dentro de este grupo aproximaciones fue desarrollado por Mizaei y colaboradores [241] y se fundamenta en la derivatización de las proteínas carboniladas con BHZ, que al igual que el DNPH y la FTSC, contiene un grupo hidrazida que reacciona específicamente con los carbonilos proteicos. A continuación, se realiza una cromatografía de afinidad con avidina para aislar y enriquecer las proteínas carboniladas, que serán a continuación digeridas en solución con tripsina [241]. Finalmente, los péptidos resultantes se analizan por cromatografía líquida capilar (nano- o micro-) de fase reversa acoplada a espectrometría de masas en tándem ((n)(μ)LC-MS/MS) [224].

Posteriormente, se han realizado modificaciones sobre este protocolo básico, combinando esta técnica con estrategias de la proteómica cuantitativa como el marcaje con isótopos estables como el ICAT o más recientemente el iTRAQ [242], principalmente orientados a la detección y cuantificación de los residuos oxidados dentro de las proteínas.



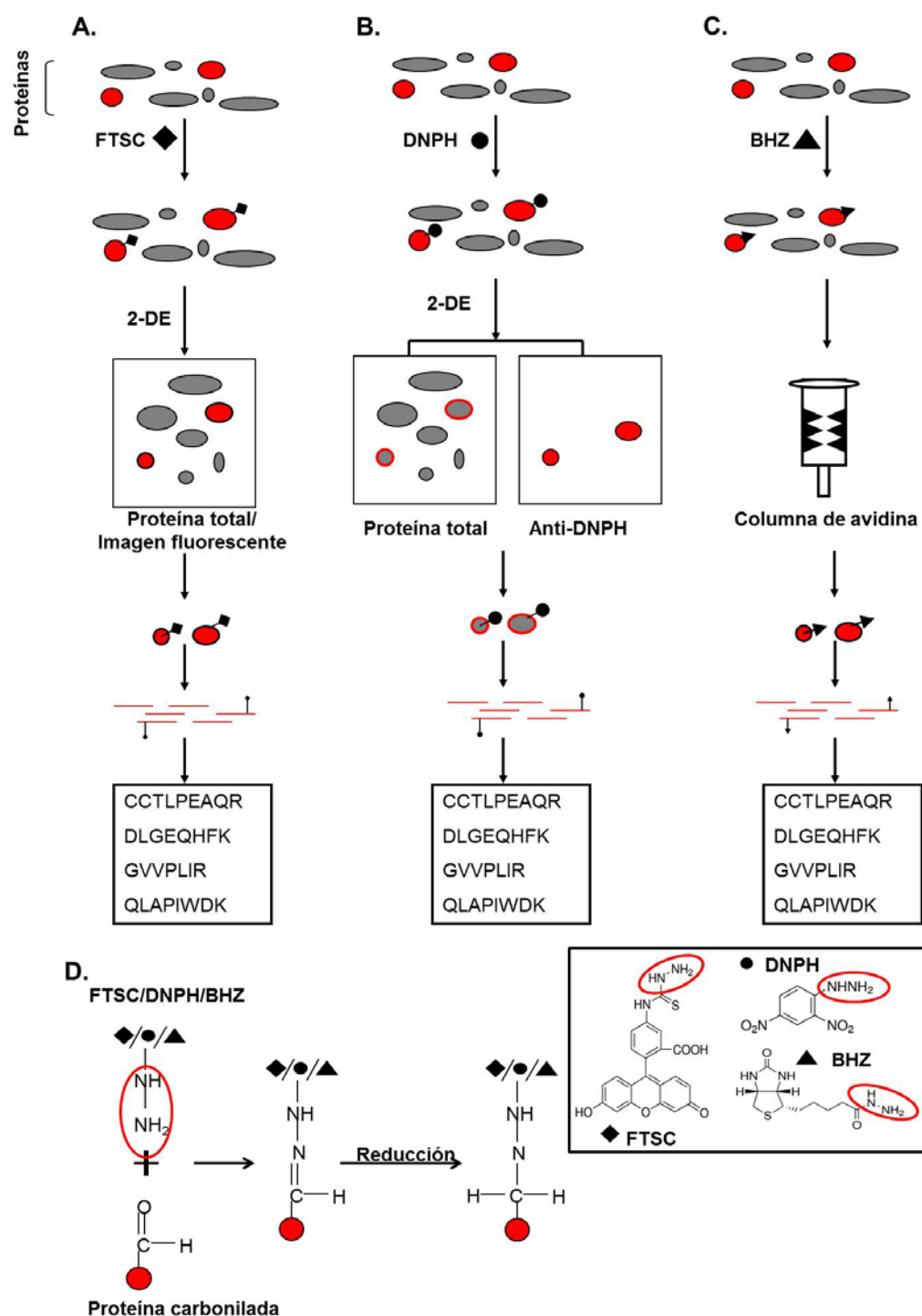


Figura 12. Esquema comparativo entre los métodos más frecuentes para la detección e identificación de las proteínas carboniladas presentes en una muestra. A. Protocolo basado en la derivatización de las proteínas carboniladas con FTSC y análisis mediante 2-DE acoplado a MS. B. Protocolo basado en la derivatización de las proteínas carboniladas con DNPH y análisis mediante 2-DE y Western blot acoplados a MS. C. Protocolo basado en la derivatización de las proteínas carboniladas con BHZ, aislamiento mediante cromatografía de afinidad con avidina y análisis por MS. D. Mecanismo general de reacción para la conjugación de FTSC, DNPH o BHZ a las proteínas carboniladas.

4.3. Proteómica cuantitativa

La cantidad de proteínas presente en un sistema biológico en un determinado momento es un reflejo directo de su estatus, así como los cambios en su abundancia reflejan la respuesta del sistema ante los efectos del ambiente, los estímulos químicos o los procesos fisiológicos y patológicos. La cuantificación de estos cambios es, por tanto, clave a la hora de entender las alteraciones biológicas de los sistemas y supone uno de los mayores retos a los que se enfrenta la proteómica.

Se han desarrollado multitud de estrategias para el análisis fiable de este aspecto del proteoma (Wasinger), que puede ser abordado de manera relativa o absoluta. De manera similar a lo ocurrido en el campo de la proteómica redox y por extensión en el resto de áreas de la proteómica, las principales técnicas de proteómica cuantitativa pueden dividirse en técnicas basadas en gel y técnicas libres de gel (o cuantificación basada en espectrometría de masas).

4.3.1. Proteómica cuantitativa basada en gel

Los primeros procedimientos desarrollados dentro de la proteómica cuantitativa estaban unidos a la separación del proteoma mediante geles 2-DE [225] y a la determinación de la cantidades proteicas mediante el uso de tintes visibles como la plata o el Coomassie o bien tintes fluorescentes como Sypro Ruby, Lava y Deep Purple.

Con el objetivo de superar algunas de las limitaciones inherentes a la metodología 2-DE (mencionadas en las secciones previas), en 1997, Ünlü y colaboradores [243] combinaron el marcaje fluorescente de las proteínas con la separación mediante geles bidimensionales, dando lugar a una nueva aproximación basada en 2-DE llamada DIGE (del inglés “Differential In Gel Electrophoresis”), consiguiendo disminuir la variabilidad de la técnica, aumentar el poder estadístico y reducir el tiempo experimental.

Características de la electroforesis diferencial (2D-DIGE)

Esta técnica basada en gel se fundamenta en el marcaje directo de las proteínas con reactivos fluorescentes, conocidos como NHS-CyDyes (NHS-Cy2, -Cy3 y -Cy5), previo a la realización del isoelectroenfoque. El protocolo original desarrollado por Ünlü y colaboradores [243] incluía únicamente el marcaje de las proteínas con los reactivos NHS-Cy3 y -Cy5, que son compuestos espectralmente distintos (con máximos de emisión a 590 y 680 nm,

respectivamente), permitiendo la detección de las señales espectrofotométricas emitidas por las dos muestras objeto de estudio sin que exista solapamiento entre las mismas. Además, los reactivos Cy3 y Cy5 poseen masas moleculares muy parecidas (582.8 y 580.7 Da, respectivamente) de forma que no afectan significativamente a la separación electroforética de las muestras marcadas.

La introducción posterior de un tercer reactivo de marcaje, llamado NHS-Cy2TM [244] permitió el análisis simultáneo de tres muestras sobre un único gel. Aunque las propiedades espectrofotométricas de este tercer reactivo se solapan en cierta medida con Cy3, ya que posee un máximo de emisión a 530 nm, y presenta una masa molecular ligeramente distinta a los reactivos originales (550.6 Da), su inclusión dentro del protocolo de 2D-DIGE aportó numerosas ventajas, principalmente derivadas de la posibilidad de incorporar un estándar interno al análisis.

La utilización de un estándar interno, que normalmente consiste en una mezcla de cantidades idénticas de todas las muestras objeto de estudio, permitió reducir significativamente el número de geles necesarios para la correcta realización de un experimento 2D-DIGE dado, puesto que puede ser añadido en todos los geles al mismo tiempo que los pares de muestras evaluadas y marcadas con Cy3 y Cy5. En consecuencia, no solo mejora la precisión de la cuantificación relativa de los spots de proteínas a lo largo de los geles actuando como un control de carga, sino que facilita la correspondencia de los spots entre los geles, disminuyendo en parte la variación gel-a-gel inherente a un experimento mutitigel como es el 2D-DIGE [245].

Los tres reactivos NHS-Cy3, -Cy5 y -Cy2 reaccionan con los grupos amina primarios (los grupos α -amino N-terminal y ϵ -amino de la lisina) de la proteína diana de la muestra a través de una reacción de sustitución nucleofílica [246]. Puesto que se trata de una estrategia basada en geles bidimensionales, es importante resaltar que el marcaje con estos reactivos no altera el punto isoeléctrico de las proteínas porque los NHS-CyDyes tienen una carga positiva que reemplaza a la carga positiva de las lisinas a pH 8.5, que es el pH en el que se produce el marcaje (Figura 13).

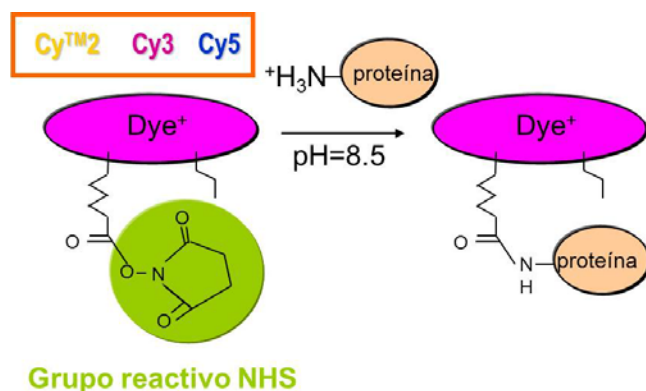


Figura 13. Esquema representativo del marcaje de las proteínas con los reactivos NHS-CyDyes.

Una característica importante de este proceso es que normalmente las proteínas son sometidas a marcaje “mínimo”, es decir, que menos del 5% de las especies proteicas y solamente entre el 1-2% de los residuos de lisina serán marcados [247]. Este marcaje mínimo aporta numerosas ventajas ya que consigue una excelente sensibilidad sin que se detecte ningún efecto sobre la solubilidad de las proteínas. Además, proporciona una respuesta lineal de hasta 4 órdenes de magnitud y un límite de detección de un nanogramo de proteína, que convierte a DIGE en una técnica ligeramente más sensible que la tinción con plata o con SyproRuby [246].

Otra ventaja importante del marcaje mínimo es que reduce la probabilidad de interferir con la digestión triptica en gel posterior, ya que deja libre muchos residuos de lisina sobre los que todavía puede actuar la tripsina, ni con la identificación de los péptidos por MS. Como efecto negativo, está el hecho de que la masa adicional que supone el NHS-CyDye puede causar que la minoría marcada (ese 5%) migre más lentamente que la mayoría no marcada, conduciendo a una separación electroforética en la segunda dimensión, que va a ser más evidente en el rango de menor masa de los geles [248].

Una vez realizado el marcaje, tal y como refleja la figura 14, cantidades equivalentes de las proteínas diferencialmente marcadas se mezclan y se someten a la separación por 2-DE. A continuación, empleando un escáner de multilongitud de onda, se realiza el escaneado de la imagen fluorescente para generar las tres imágenes superpuestas correspondientes a cada NHS-CyDyes. Finalmente, el análisis de las imágenes obtenidas así como el análisis estadístico se puede hacer empleando el mismo software informático, como puede ser el DeCyder Differential In-gel Analysis (Amersham Biosciences), un software específicamente diseñado

para el método 2D-DIGE. Tras el análisis, las proteínas de interés se recortarán, se digerirán y se identificarán mediante espectrometría de masas [248].

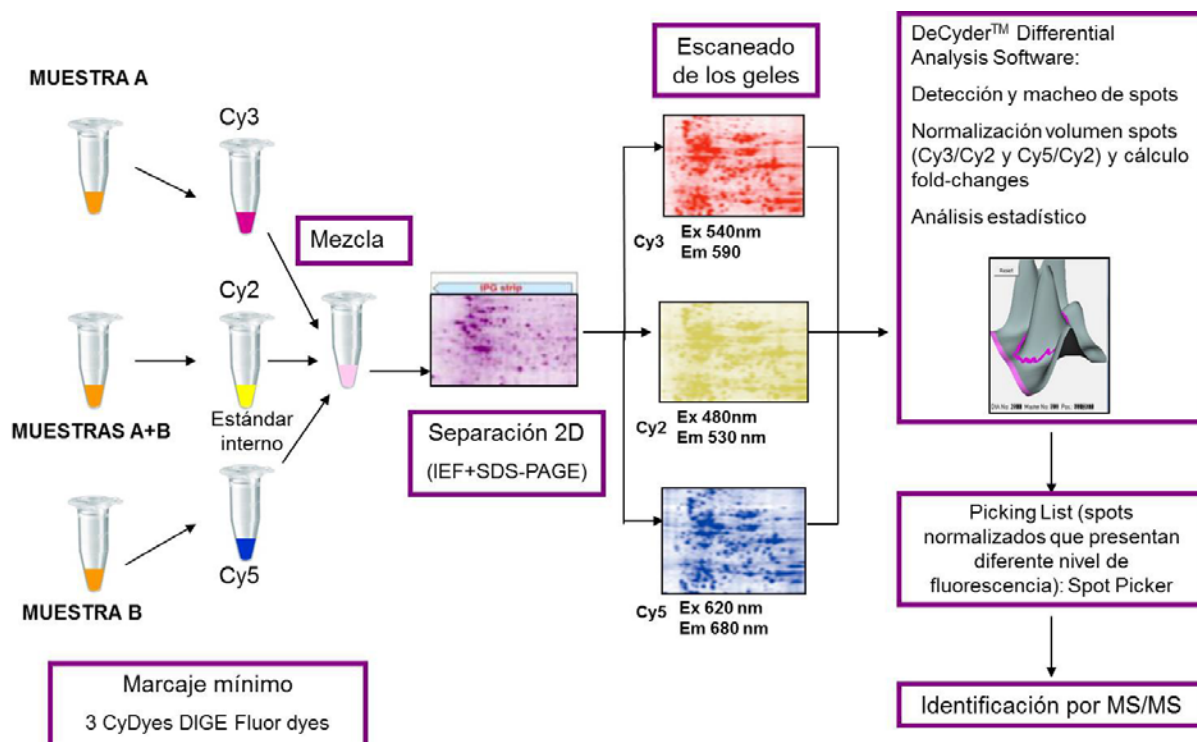


Figura 14. Esquema representativo de las principales etapas del protocolo experimental 2D-DIGE.

4.3.2. Proteómica cuantitativa basada en espectrometría de masas

A pesar de la buena sensibilidad, linealidad y rango dinámico de cuantificación, las aproximaciones proteómicas basadas en gel presentan algunas limitaciones difíciles de superar, que han sido recogidas en las secciones previas. Por ello, se han desarrollado los métodos cuantitativos libres de gel (basados en espectrometría de masas), que han ido evolucionando de forma paralela a los avances en la propia espectrometría de masas [249].

En comparación con los métodos tradicionales basados en gel, la proteómica cuantitativa basada en espectrometría de masas ofrece una mayor reproducibilidad, permite el análisis de proteínas de bajo peso molecular, de escasa abundancia o con pI extremos. Asimismo, puesto que es inherente al método, permite la identificación directa de las proteínas alteradas [250]. Sin embargo, también presenta algunas limitaciones derivadas tanto de las propiedades de la muestra como del propio método analítico.

Con respecto a las limitaciones derivadas de la muestra, el amplio rango de abundancias de las proteínas celulares, que puede llegar a ser de 7 hasta 12 órdenes de magnitud [251], suele implicar la necesidad de realizar un prefraccionamiento de la muestra que incrementa de manera significativa la complejidad del análisis. También debe considerarse la existencia de un elevado número de modificaciones postraduccionales (PTMs) y del fenómeno del *splicing* alternativo, que multiplican el número de especies proteicas que pueden ser difíciles de distinguir y por tanto, de cuantificar en las aproximaciones libres de gel debido a la similitud de su secuencia.

La preparación adecuada de la muestra, que es laboriosa y relativamente lenta, la necesidad de cantidades relativamente elevadas de proteína y la escasa confianza que en ocasiones se consigue en los resultados cuando muchos de los péptidos cuantificados son únicos o de poca calidad, constituyen algunas las limitaciones principales derivadas de la propia metodología analítica.

Como consecuencia de estas limitaciones, se ha descrito que sólo una fracción de las proteínas presentes en una muestra determinada podrá ser identificada y de ella, sólo una parte podrá ser cuantificada de manera fiable por técnicas basadas en MS [249] (Figura 15).

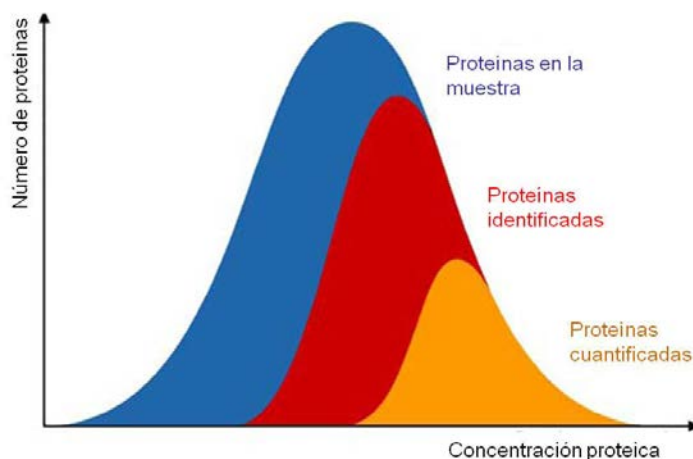


Figura 15. Representación esquemática de la fracción de un proteoma que puede ser identificada o cuantificada por proteómica basada en MS. Adaptada de la referencia [249].

Las principales estrategias de la espectrometría de masas cuantitativa pueden englobarse en las que utilizan un marcaje de las proteínas y las metodologías “libres de marca” (“Label Free”) [252].

4.3.2.1. Metodologías cuantitativas basadas en el marcaje con isótopos estables

El objetivo principal de los diferentes tipos de marcaje con isótopos estables para la cuantificación de proteínas o péptidos es que las propiedades fisicoquímicas de los péptidos naturales y los marcados sean lo más parecidas posibles, si no idénticas. Por tanto, los diferentes isótopos diseñados para la cuantificación ya sea relativa o absoluta de las proteínas deberán cumplir con este objetivo [253]. Partiendo de esta premisa, se pueden seguir diferentes estrategias de marcaje, principalmente el marcaje metabólico, el químico y el enzimático.

4.3.2.1.1. Marcaje metabólico

En las estrategias de marcaje metabólico, el isótopo de marcaje se introduce dentro de cada proteína durante el crecimiento y la división celular. Constituyen por tanto, el tipo de marcaje más temprano que puede realizarse dentro de un flujo de trabajo proteómico [252].

Uno de los métodos más populares de marcaje metabólico es el conocido como SILAC (de sus siglas en inglés “Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture”) [254]. Aunque tradicionalmente se trata de una técnica empleada para el marcaje en cultivos celulares (de ahí su nombre), también se ha sido usada para marcar organismos completos [255].

En un experimento clásico de SILAC, el marcaje se produce adicionando al medio de cultivo aminoácidos de lisina y arginina marcados con isótopos estables ligeros (que serán la forma natural, ^{12}C o ^{14}N) o pesados (^{13}C o ^{15}N). De esta manera, se asegura que la mayoría de los péptidos obtenidos tras la digestión trípica contengan al menos un aminoácido marcado, ya que la tripsina corta las proteínas por los residuos de lisina y arginina [252].

El marcaje SILAC permite la comparación directa de los niveles de proteínas entre las muestras mezclando los péptidos procedentes de ambas poblaciones celulares, que han sido diferentemente marcadas [256], de forma que cada péptido aparece como un par en el espectro MS^1 con una diferencia de masa entre la forma ligera y pesada de 0.6 Da, donde las intensidades relativas de cada pico se corresponden con su abundancia. Con este procedimiento se consigue una elevada exactitud y precisión en la cuantificación, ya que minimiza los errores sistemáticos derivados del manejo de la muestra.

4.3.2.1.2. Marcaje químico

El empleo de estrategias de marcaje químico ha crecido enormemente en los últimos años. Las estrategias de marcaje químico de proteínas y péptidos implican un marcaje posterior a su biosíntesis y en principio en estos métodos, cualquier grupo reactivo puede ser marcado usando un isótopo estable dado. Sin embargo, la mayoría de las técnicas actuales utilizan como diana el extremo N-terminal de los péptidos o proteínas y el grupo ϵ -amino de la lisina. Quizás los dos métodos de marcaje químico más usados en la actualidad sean el TMTs (“Tandem Mass Tags”) y el iTRAQ (“Isobaric Tags for Absolute and relative Quantification”). Ambos métodos marcan aminas primarias y son llamados tags isobáricos.

Fundamentos del marcaje iTRAQ

El iTRAQ es una técnica de marcaje multicanal (multiplex) que emplea la espectrometría de masas para la cuantificación relativa de proteínas [257]. El éxito del marcaje iTRAQ deriva de que se trata de una técnica eficiente de marcaje y bastante simple de cuantificación relativa de proteínas. Además presenta la ventaja de que permite analizar hasta ocho muestras diferentes en un único experimento (de ahí el concepto de multicanal). Actualmente, el iTRAQ está disponible en formato de cuatro (4-plex) u ocho (8-plex) canales [252].

Los reactivos de marcaje empleados en un experimento iTRAQ tienen masas idénticas (son isobáricos), pero se pueden distinguir en la fragmentación del péptido que se produce dentro del espectrómetro de masas, en la cual se libera lo que se conoce como grupo reportero o “reporter”, que es el un grupo que retiene la carga (para poder ser detectado por el MS) y es el que va a determinar el marcaje diferencial [258]. En el formato 4-plex, las masas iónicas del reporter van desde 114-117 m/z, mientras que en el formato 8-plex las masas van desde 113-121 m/z (no 120 que es la m/z del imonio de fenilalamina). Además del reporter, en la molécula también se encuentra el grupo que reacciona específicamente con el grupo amina del péptido, que al igual que en DIGE es un grupo NHS, y lo que se conoce como grupo balanceado, que se utiliza para compensar las diferencias de carga del grupo reporter, consiguiendo así un tag isobárico [251]. En la figura 16 se muestran la estructura básica de los tags del iTRAQ 4-plex.

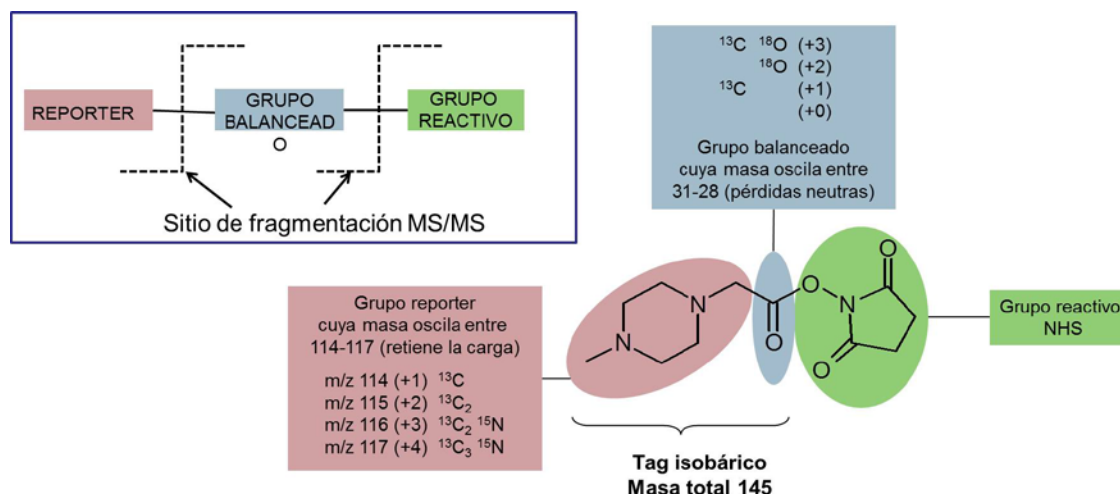


Figura 16. Estructura de los reactivos del iTRAQ 4-plex.

Normalmente, el marcaje dentro de un experimento de iTRAQ se realiza a nivel de péptido, después de la digestión con tripsina. Esto se debe a que los tags del iTRAQ marcan de manera muy eficiente los residuos de lisina, impidiendo que la tripsina los corte. Por tanto, si el marcaje se realizara antes de la digestión, la tripsina sólo sería capaz de reconocer y cortar las proteínas por los residuos de arginina. En consecuencia, se generaría un número limitado de péptidos para realizar la cuantificación [252].

El marcaje a nivel de péptido permite por tanto obtener un elevado número de péptidos marcados que pueden ser cuantificados (casi todos los péptidos de la proteína), por lo que aumenta la confianza de cuantificación. Sin embargo, esta elección puede aumentar la posibilidad de pérdidas y errores durante la preparación posterior de la muestra debido al tardío marcaje así como incrementar la complejidad de la misma. Por su parte, el marcaje a nivel de proteína puede ser ventajoso en determinadas circunstancias, ya que reduce la complejidad de la muestra y permite obtener información sobre posibles modificaciones postraduccionales o sobre el grado de degradación proteica [249].

En cualquier caso, una vez realizado el marcaje, cantidades idénticas de cada muestra se mezclan y se analizan por espectrometría de masas. La cuantificación se realiza en los espectros de MS/MS después de la fragmentación del péptido, durante la cual los tags del iTRAQ se fragmentan liberando los iones reporteros. Las medidas de las intensidades de estos iones es la que permite la cuantificación relativa de los péptidos presentes en cada muestra, empleando uno de los tags como muestra de referencia [258].

4.3.2.1.3. Marcaje enzimático

Esta metodología se basa en el marcaje isotópico estable con ^{18}O . Constituye una técnica rápida y fiable que consiste en la introducción de una molécula de ^{18}O en el aminoácido C-terminal del péptido en el proceso de digestión con tripsina [259].

El marcaje enzimático presenta algunas ventajas respecto a otras técnicas, entre las que se incluyen que aplicarse a todo tipo de muestras, que es muy eficiente ya que se consiguen marcar todos los péptidos, que no existe riesgo de pérdida de muestra por pasos de purificación intermedios y que la cantidad de muestra que se requiere es muy pequeña. Sin embargo, la escasa diferencia de masa, sólo 2 ó 4 Da, según se incorporen una o dos moléculas de ^{18}O , requiere el empleo de espectrómetros de masa de media o alta resolución para poder llevar a cabo la cuantificación, como es el caso de los FTICR, los TOF o incluso las trampas iónicas lineales [260].

4.3.2.2. Metodologías Label-free

Finalmente los métodos cuantitativos libres de marca consisten en la búsqueda de diferencias estadísticas en las señales de intensidad de los iones o en las áreas de los picos cromatográficos entre varias carreras de LC-MS. Estos métodos están basados en las relaciones lineales entre la señal y la concentración del analito en el eluyente cromatográfico. Sin embargo, existen varias limitaciones intrínsecas a la propia técnica como pueden ser los efectos de supresión de iones en los equipos de MS. Estos problemas pueden ser solventados gracias a la utilización de equipos de UPLC e instrumentos de alta resolución como el FTICR.

4.4. Aplicación de la proteómica redox y la proteómica cuantitativa a la investigación nutricional

4.4.1. Estado del arte de la proteómica y la proteómica nutricional

Desde la irrupción de la proteómica hace aproximadamente 15 años, el interés de la comunidad científica por incorporar el enfoque proteómico a sus investigaciones en los diferentes campos de la ciencia ha ido creciendo progresivamente, en paralelo a los avances producidos en la espectrometría de masas y la bioinformática. Conforme a esta observación, el número de publicaciones proteómicas encontradas en la base de datos Scopus (www.scopus.com), probablemente la mayor base de datos de resúmenes y referencias bibliográficas de literatura científica, ha ido aumentando de manera lineal desde el año 2.000 (Figura 13A). En la actualidad, alrededor de 80.000 publicaciones relacionadas con la proteómica se encuentran disponibles en Scopus, mayoritariamente, artículos originales (68%) y revisiones (17%) publicadas en revistas de revisión por pares, pero también capítulos de libros, conferencias o editoriales.

Sin embargo, la aplicación de las metodologías proteómicas a la investigación nutricional es todavía escasa. Hasta el año 2014, solamente el 5% de todas las publicaciones proteómicas encontradas en Scopus estaban relacionadas con la nutrición, incluyendo aquellas enfocadas al estudio de alteraciones metabólicas o enfermedades crónicas donde el componente nutricional juega un papel clave en su etiología, tales como la obesidad, el síndrome metabólico, la diabetes o las enfermedades cardiovasculares (Figura 17B). Por otro lado, pese a este bajo porcentaje, un hecho innegable es que la proteómica nutricional es una subdisciplina en crecimiento dentro de la proteómica, puesto que el porcentaje de publicaciones en este campo con respecto al total de publicaciones relacionadas con la proteómica se ha ido incrementando progresivamente desde el año 2.000 (del 3% inicial al 5% actual) (Figura 17A).

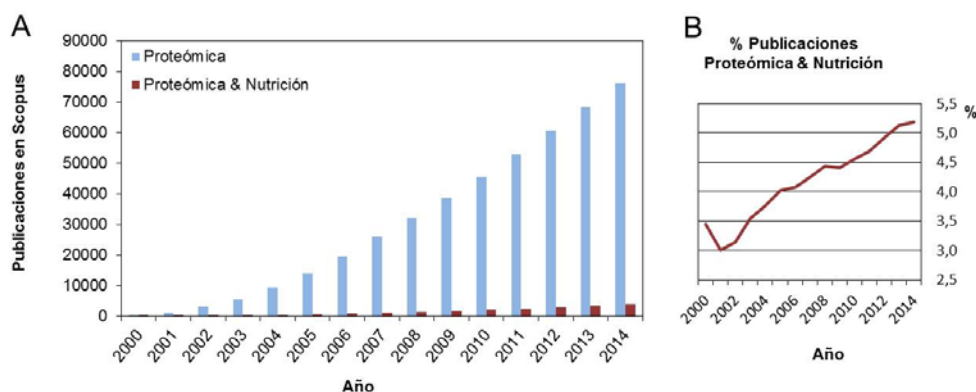


Figura 17. A).Evolución del número total de publicaciones en proteómica y proteómica nutricional durante el siglo XXI. Los datos se generaron empleando la opción de búsqueda avanzada de la base de datos Scopus, introduciendo “TITLE-ABS-KEY (proteomics)” para la búsqueda de las publicaciones en proteómica, y “TITLE-ABS-KEY (proteomics AND nutrition OR diet OR obesity OR fatty liver OR metabolic syndrome OR diabetes OR cardiovascular disease)” para la búsqueda de las publicaciones en proteómica nutricional. La opción “TITLE-ABS-KEY” permitió refinar la búsqueda, mostrando únicamente las publicaciones donde los parámetros de búsqueda aparecen al menos en el título, el resumen o las palabras claves. B). Evolución del porcentaje de publicaciones relacionadas con la proteómica nutricional respecto al total de publicaciones en proteómica durante el siglo XXI.

4.4.2. Estado del arte de la proteómica nutricional cuantitativa y redox

El estudio de la proteómica nutricional puede ser abordado desde diferentes ópticas. A continuación, se repasarán las publicaciones relacionadas con la aplicación de herramientas de la proteómica redox y la proteómica cuantitativa al campo de la nutrición, puesto que son las dos subdisciplinas de la proteómica nutricional en las que se enmarca la presente tesis doctoral.

Refinando la búsqueda de las publicaciones relacionadas con la proteómica nutricional encontradas en la base de datos Scopus, se comprobó que aproximadamente el 60% de las publicaciones actualmente disponibles (alrededor de 2.200) se relacionan con el análisis cuantitativo de las proteínas. Por su parte, el número de publicaciones que enfocan el análisis de su estado redox es mucho menor, menos de 180 publicaciones, lo que supone alrededor del 5% del total (Figura 18).

La proteómica cuantitativa es, en consecuencia, una herramienta comúnmente empleada en la investigación nutricional centrada en el análisis de las proteínas, cuya importancia ha crecido en los últimos años (Figura 18B) impulsada por el avance en las técnicas de análisis de proteínas, sobre todo por el enorme incremento en la sensibilidad de los espectrómetros de masas, que han permitido abordar el análisis cuantitativo a gran escala de numerosos proteomas y subproteomas.

Los avances en la espectrometría de masas también han impulsado el nacimiento de otras subdisciplinas, principalmente las que abordan el estudio de las PTMs de las proteínas, tales como la proteómica redox. Aunque, como se ha mencionado anteriormente, su aplicación a la investigación nutricional es todavía minoritaria, está claro que se trata de subdisciplina en crecimiento dentro de la proteómica nutricional, puesto que el porcentaje de publicaciones correspondientes a la misma incrementa de año en año (Figura 18C).

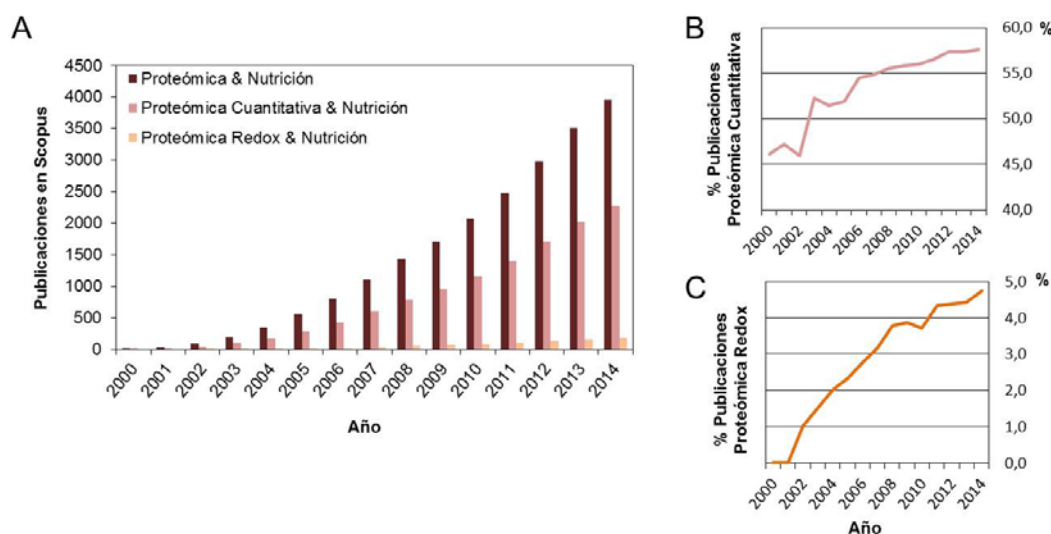


Figura 18. A).Evolución del número total de publicaciones en Proteómica Nutricional, Proteómica Cuantitativa Nutricional y Proteómica Redox Nutricional durante el siglo XXI. Los se generaron empleando la opción de búsqueda avanzada de la base de datos Scopus, introduciendo “TITLE-ABS-KEY (proteomics)” para la búsqueda de las publicaciones en Proteómica, y “TITLE-ABS-KEY (proteomics) AND TITLE-ABS-KEY (nutrition OR diet OR obesity OR fatty liver OR metabolic syndrome OR diabetes OR cardiovascular disease)” para la búsqueda de las publicaciones en Proteómica Nutricional. La opción “TITLE-ABS-KEY” permite refinar la búsqueda, mostrando únicamente las publicaciones donde los parámetros de búsqueda aparecen al menos en el título, el resumen o las palabras claves. B). Evolución del porcentaje de publicaciones relacionadas con la proteómica nutricional cuantitativa durante el siglo XXI. C). Evolución del porcentaje de publicaciones relacionadas con la proteómica redox nutricional durante el siglo XXI.

4.4.2.1. Proteómica y carbonilación proteica aplicada a la investigación nutricional

Desde las investigaciones pioneras llevadas a cabo por Levine y Standman [203, 219], la carbonilación de las proteínas ha sido frecuentemente estudiada tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante la aplicación de diversas técnicas bioquímicas y analíticas (véase la sección 4.2.3.), siendo pronto reconocida como un marcador universal de estrés oxidativo ligado a varios desórdenes humanos, principalmente al envejecimiento y a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson [195, 207].

En el campo de la nutrición, numerosas investigaciones (alrededor de 1.200 publicaciones recogidas en Scopus) han incluido la determinación de los niveles globales de carbonilación proteica como marcador general de estrés oxidativo asociado a la dieta o a las alteraciones metabólicas inducidas por la misma. En estos estudios, el método comúnmente empleado es el análisis espectrofotométrico o inmunoquímico basado en la reacción de los grupos carbonilos con DNPH. En este sentido, se pueden encontrar diversas revisiones que recogen el papel de la carbonilación proteica como marcador de estrés oxidativo en la investigación en nutrición (véanse por ejemplo las revisiones [261-264]).

Sin embargo, la aplicación de las herramientas proteómicas para la caracterización de los perfiles de carbonilación proteica en este contexto de la investigación nutricional es todavía minoritaria. Actualmente, sólo un 5% aborda este aspecto de la proteómica redox.

Entre los estudios que han definido los cambios en los perfiles de carbonilación proteica asociados de manera específica a las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta, la diabetes constituye una de las enfermedades más estudiadas. Por ejemplo, Oh-Ishi y colaboradores [265] evaluaron el efecto de la diabetes sobre las proteínas musculares, mediante la comparación de los perfiles de carbonilación encontrados en los músculos esquelético y cardíaco de ratas diabéticas OLETF con sus respectivos controles sanos. En este caso, emplearon un protocolo basado en la derivatización de los grupos carbonilos con biotina-hidrazida, separación de las proteínas carboniladas por 2DE y la identificación y cuantificación relativa mediante la realización de Western blot y análisis por MS.

El efecto de la diabetes sobre los perfiles de carbonilación de las proteínas en el plasma fue evaluado en ratas por Madian y colaboradores, comparando los niveles de proteínas carboniladas entre ratas diabéticas Zucker y sus controles sanos [242]. La identificación y cuantificación de las proteínas se realizó aplicando la aproximación iTRAQ a la fracción de

proteínas carboniladas presentes en el plasma, que fueron purificadas gracias a la derivatización de los grupos carbonilo con biotina y posterior aislamiento mediante cromatografía de afinidad con avidina. Adicionalmente, esta aproximación permitió la localización y cuantificación relativa de los sitios específicos de oxidación dentro de las proteínas. De forma paralela, estos autores evaluaron el efecto protector de los antioxidantes presentes en el té verde sobre el nivel de carbonilación de las proteínas del plasma en este modelo de ratas diabéticas Zucker [266]. En humanos, Bollineni y colaboradores determinaron los perfiles diferenciales de carbonilación de las proteínas del plasma en pacientes obesos o pacientes obesos que además sufrían diabetes tipo 2, mediante la derivatización con biotina de los grupos carbonilos, aislamiento por cromatografía de afinidad con avidina y análisis por MS [267].

Asimismo, el efecto que la obesidad ejerce sobre los niveles específicos de carbonilación proteica fue evaluado en el tejido adiposo blanco, en un estudio realizado por Grimsrud y colaboradores. Estos autores identificaron las proteínas carboniladas presentes en el tejido adiposo procedente de ratones obesos, siguiendo para ello el protocolo basado en el aislamiento de las proteínas carboniladas mediante cromatografía de afinidad biotina-avidina y análisis por MS [268].

En el hígado, el estudio de la carbonilación proteica inducida por obesidad o resistencia a insulina ha sido frecuentemente orientado a la caracterización de los mecanismos que vinculan la carbonilación de las proteínas con el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD, del inglés “Non Alcoholic Fatty Liver Disease”).

Esta enfermedad, que se considera la manifestación del síndrome metabólico en el hígado, engloba un amplio espectro de alteraciones, desde la simple esteatosis (acumulación de grasa en los hepatocitos) hasta la esteatohepatitis (que implica inflamación) y finalmente la fibrosis avanzada y la cirrosis [269]. Para explicar el origen del hígado graso y su posterior evolución hacia esteatohepatitis, se propuso la hipótesis del “doble impacto”, válida para la NAFLD, pero también para la enfermedad del hígado graso inducida por el consumo de alcohol (AFLD, del inglés alcoholic fatty liver disease) o por determinados medicamentos. Según esta hipótesis, la sobreacumulación de lípidos en los hepatocitos (primer impacto) conduciría a un incremento del estrés oxidativo y otros eventos citotóxicos (segundo impacto) que culminarían en esteatohepatitis [270]. Acorde a esta teoría, numerosos estudios encontraron una elevación de los marcadores de estrés oxidativo, incluyendo la carbonilación

proteica, asociada a presencia de esteatosis o esteatohepatitis [190, 271, 272]. Sin embargo, muy pocos estudios han conseguido identificar las dianas específicas de carbonilación proteica asociadas a estas patologías. Entre estos estudios, se encuentra la investigación realizada por Hu y colaboradores [273]. Estos autores evaluaron el efecto protector del ejercicio físico sobre el desarrollo de la NAFLD, identificando los cambios sufridos en el perfil de carbonilación proteica del hígado de ratas sometidas a un programa de entrenamiento moderado. Para ello, aislaron las proteínas carboniladas del hígado mediante cromatografía de afinidad biotina-avidina y análisis por MS. Este mismo protocolo fue también empleado para la determinación de los cambios en los perfiles de carbonilación proteica asociados a la enfermedad del hígado graso inducida por el consumo de alcohol [274, 275] o inducida por el tratamiento con antibióticos como la tetraciclina [276].

En relación a la hipertensión, Tyther y colaboradores publicaron un estudio en el que identificaron las proteínas diferencialmente carboniladas presentes en la médula del riñón de ratas espontáneamente hipertensas (ratas SHR) en comparación con los controles sanos normotensos, empleando el método de derivatización de los carbonilos con DNPH, separación en geles 2DE, detección por Western blot e identificación de las proteínas carboniladas por MS [277].

En conclusión, los estudios disponibles actualmente en la bibliografía parecen reflejar que las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta influyen sobre el nivel de carbonilación de proteínas celulares específicas. Sin embargo, la información obtenida es todavía insuficiente para permitir establecer de manera inequívoca cuáles son las dianas proteicas de carbonilación asociadas a las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta y cuáles son las consecuencias biológicas de dicha carbonilación. Menos aún se conoce sobre el efecto que el consumo de ciertos alimentos funcionales o nutraceuticos ejerce sobre los perfiles de carbonilación proteica. Este puede ser el caso de componentes bioactivos como los ácidos grasos omega-3 del pescado o los polifenoles procedentes de la uva, sobre los que se ha realizado un importante esfuerzo investigador a nivel de mecanismos en el contexto de la prevención de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta, pero sin profundizar en la perspectiva de la carbonilación específica de las proteínas celulares.

4.4.2.2. Proteómica cuantitativa aplicada a la investigación nutricional

La aplicación de las herramientas de la proteómica cuantitativa a la investigación nutricional puede ofrecer información valiosa sobre el modo en que la dieta influye sobre determinadas rutas y procesos metabólicos que tienen lugar en los organismos vivos. La determinación de los cambios en los niveles de las proteínas celulares es una estrategia relativamente frecuente dentro de la investigación nutricional. Sin embargo, los estudios realizados a nivel del transcriptoma, mediante el empleo de microarrays que permiten evaluar los cambios cuantitativos a nivel de expresión génica, continúan siendo el método de rutina empleado para determinar la respuesta celular a los cambios inducidos por la dieta o por las alteraciones metabólicas ligadas a la misma [179].

Numerosas investigaciones en el campo de la nutrición han abordado el estudio cuantitativo del proteoma, y pese a los avances en las metodologías analíticas, las aproximaciones basadas en geles de electroforesis continúan siendo las herramientas más comúnmente empleadas. De hecho, clasificando las publicaciones en este campo en base a la metodología proteómica aplicada, se obtuvo que casi el 60% de las publicaciones empleó aproximaciones basadas en geles de electroforesis, (principalmente 2DE y en menor medida 2D-DIGE) (Figura 19).

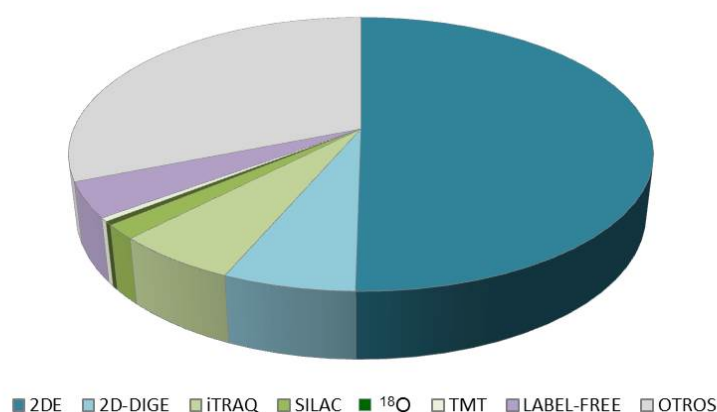


Figura 19. Distribución de las publicaciones relacionadas con la aplicación de las herramientas de la proteómica cuantitativa al campo de la investigación nutricional actualmente disponibles en la base de datos Scopus clasificadas según el tipo de metodología empleada.

En conjunto, la aplicación de estas técnicas ha permitido evaluar los cambios en el proteoma asociados al consumo de diferentes tipos de dieta, en diferentes tipos de tejidos y bajo diferentes condiciones patológicas o fisiológicas. También se han ensayado diferentes compuestos naturales o sintéticos para el tratamiento de determinadas enfermedades asociadas

a la dieta. A continuación, se repasarán de manera específica las publicaciones enfocadas al estudio del efecto del consumo de dietas occidentalizadas o de las alteraciones metabólicas directamente relacionadas con dicho consumo, así como aquellas investigaciones que han analizado el efecto de la ingesta de alimentos funcionales o nutraceuticos, concretamente de los omega-3 de pescado y los polifenoles, que son objetivo de la presente tesis doctoral.

Proteómica cuantitativa aplicada al estudio de las alteraciones metabólicas inducidas por el consumo de dietas occidentalizadas

Alrededor de 160 publicaciones han investigado el efecto que el consumo de dietas altas en grasa y/o en carbohidratos, típicas de los países desarrollados, ejerce sobre la regulación de los niveles de las proteínas celulares en diferentes órganos y tejidos, y lo han vinculado a la progresión de numerosas enfermedades humanas, que incluyen no sólo alteraciones metabólicas como la obesidad, la diabetes o las enfermedades cardiovasculares, sino también enfermedades neurodegenerativas y trastornos como las cataratas o la infertilidad.

En este escenario, el hígado ha sido frecuentemente usado como tejido diana por su papel clave en el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos. Al igual que en los estudios sobre la carbonilación proteica, los cambios cuantitativos producidos sobre el proteoma hepático han sido mayoritariamente vinculados al estudio de la NAFLD, siendo la aproximación basada en geles de electroforesis la estrategia comúnmente seguida para abordar el análisis.

Mediante la realización de geles 2DE e identificación de las proteínas por MS, diversos autores estudiaron la respuesta del proteoma hepático a la NAFLD inducida en ratones bien por el consumo de dietas altas en grasa [278-280] o bien como consecuencia de la diabetes, analizando para ello el hígado de ratones diabéticos db/db [281]. En ratas, también se empleó esta metodología para caracterizar los cambios producidos sobre el proteoma total [282, 283] o sobre la fracción mitocondrial del proteoma hepático [284] asociados a la NAFLD inducida por el consumo de dietas altas en grasa. Adicionalmente, algunos estudios basados en geles de electroforesis incorporaron el marcaje DIGE para evaluar el efecto sobre el proteoma de la NAFLD desarrollada por ratones obesos ob/ob [285] o inducida tras el consumo de dietas elevadas en grasa en ratones [286] y en ratas [287], o inducida tras el consumo de dietas elevadas en fructosa en ratas [288] y en hamsters [289].

Aunque de manera minoritaria, algunos estudios realizados en el hígado utilizaron metodologías libres de gel. En ratones, el marcaje iTRAQ permitió cuantificar los cambios

sufridos por el proteoma del hígado como consecuencia del consumo de una dieta elevada en grasa y en azúcares refinados [290], los cambios específicos en los niveles de las proteínas mitocondriales inducidos por el consumo de una dieta elevada en grasa [291] y los cambios originados por la obesidad desarrollada en ratones obesos ob/ob y la diabetes desarrollada en ratones diabéticos db/db [292]. En ratas, solamente se encontró un estudio que emplease el marcaje iTRAQ para estudiar la NAFLD inducida por el consumo de una dieta alta en grasa [293]. Adicionalmente, un estudio realizado en cerdos también empleó el marcaje iTRAQ para estudiar la respuesta del proteoma hepático al consumo de una dieta alta en grasa [294]. Finalmente, dos estudios han utilizado el marcaje SILAC para evaluar la influencia sobre el proteoma hepático de ratones que habían consumido o bien una dieta alta en grasa [295] o bien una dieta con un alto contenido tanto en grasa como azúcar [296].

El tejido adiposo es otro órgano frecuentemente usado como diana en este tipo de estudios. De nuevo, la mayor parte de las investigaciones encontradas utilizaron las aproximaciones basadas en geles 2DE acoplados a identificación por MS para cuantificar los cambios sufridos por el proteoma del tejido adiposo tras el consumo de dietas inductoras de alteraciones metabólicas.

Aplicando esta metodología, diversas investigaciones estudiaron el efecto del consumo de una dieta alta en grasa sobre la regulación diferencial de las proteínas del tejido adiposo en ratones [297, 298] y en ratones diabéticos db/db [299]. También en ratas, esta aproximación basada en gel permitió determinar el efecto de las dietas altas en grasa sobre la regulación del proteoma del tejido adiposo blanco y marrón [300], la influencia del sexo del animal en dicha regulación [301, 302] o el efecto de la inclusión de medicamentos como la capsaicina en la alteración de las proteínas del tejido adiposo inducida por el consumo de estas dietas [303].

En humanos, las aproximaciones cuantitativas basadas en gel (tanto 2DE como 2D-DIGE) permitieron evaluar la alteración del proteoma del tejido adiposo epicárdico y subcutáneo [304, 305], omental [306] o visceral [307] sufrida como consecuencia de la obesidad.

En menor medida, algunos estudios realizados en el tejido adiposo utilizaron las metodologías cuantitativas libres de gel. Entre estos estudios, el marcaje iTRAQ se empleó en ratones para analizar los cambios inducidos por el consumo de dietas altas en grasa sobre el proteoma del tejido adiposo marrón [308], sobre la modulación de las proteínas de membrana

del tejido adiposo blanco [309] o sobre el proceso de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1 [310].

Aplicando el marcaje ICAT, se estudió la alteración de las proteínas presentes en los cuerpos lipídicos del tejido adiposo de ratones tras el consumo de una dieta alta en grasa [311]. Finalmente, un estudio realizado en ratas empleó la aproximación label-free para determinar los cambios en las concentraciones de los péptidos intracelulares presentes en el tejido adiposo epidídimo inducidos por el consumo de una dieta occidentalizada [312].

El músculo es otro tejido diana que ha sido empleado en la investigación de la influencia de las dietas occidentalizadas sobre la regulación del proteoma celular. Todos los estudios encontrados en este tejido emplearon la metodología basada en geles de 2DE combinada con la identificación de las proteínas diferenciales por MS. Siguiendo esta estrategia, se evaluó la respuesta del proteoma del músculo esquelético en ratas tras el consumo de una dieta alta en grasa [313], la influencia del sexo del animal sobre dicha respuesta [314] y la modulación sobre las alteraciones encontradas que ejerce la capsaicina [315]. Otros estudios se realizaron sobre el tejido muscular cardíaco, para determinar cómo una dieta alta en grasa modula los niveles de las proteínas cardíacas en ratas [316, 317] o en ratones [318, 319].

Finalmente, diversos estudios fueron realizados sobre el proteoma del plasma, convirtiéndose en el fluido biológico preferencial para la búsqueda de biomarcadores proteicos asociados a enfermedades inducidas por la dieta. Mediante la realización de geles 2DE, se identificaron las proteínas alteradas en el proteoma del plasma de ratas tras el consumo de una dieta alta en grasa [320], las proteínas diferencialmente reguladas por la dieta y el sexo del animal [321] y los perfiles proteómicos que acompañan a un modelo de rata resistente a desarrollar obesidad inducida por la dieta [322]. Esta metodología fue también efectiva para la búsqueda de biomarcadores proteicos presentes en el plasma de ratones que desarrollaron diabetes tipo 2 tras el consumo de una dieta elevada en grasa [323]. Adicionalmente, el marcaje iTRAQ se empleó para el descubrimiento en el plasma de biomarcadores proteicos de la enfermedad de la arteria coronaria en ratones [324]. Por último, en humanos dos estudios aplicaron metodologías basadas en gel para evaluar la alteración en los niveles de proteínas del plasma producida por la obesidad [325] o por la ingesta de grasas *trans* [326].

Proteómica cuantitativa para determinar el efecto de los omega-3 sobre el proteoma

La bibliografía muestra la existencia de pocos estudios centrados en la caracterización de la regulación del proteoma asociado al consumo de los omega-3 de pescado y todos han empleado aproximaciones basadas en geles de electroforesis para realizar el análisis, concretamente 2DE acoplado a la identificación por MS.

En humanos, dos estudios analizaron la influencia del consumo de omega-3 sobre la modulación del perfil proteico de las células mononucleares de sangre periféricas, tras el consumo agudo [327] o prolongado [328] de estos aceites por pacientes de síndrome metabólico. Sin embargo, estos estudios utilizaron una mezcla de omega-3 PUFA, que incluía EPA y DHA, pero también su precursor ALA, por lo que los resultados obtenidos en ellos no pueden asociarse de manera exclusiva a los aceites de pescado.

El estudio del efecto específico de los aceites de pescado sobre la modulación de los perfiles proteicos fue evaluado en tres publicaciones recogidas en la literatura. El primer estudio caracterizó los cambios inducidos sobre el subproteoma mitocondrial del hígado de ratas, tras la inclusión de aceites de pescado en una dieta alta en grasa, inductora de alteraciones metabólicas [329]. Como resultado del estudio, se encontró que el aceite de pescado fue capaz de alterar los niveles de 54 proteínas respecto a la dieta control baja en grasa, modulando así el metabolismo de los ácidos grasos y los aminoácidos e incrementando la oxidación de los lípidos y la fosforilación oxidativa.

Un segundo estudio determinó la respuesta de la fracción citosólica del proteoma del hígado frente a la suplementación con aceites de pescado o sólo con DHA de ratones que habían sido alimentados con una dieta alta en grasa y en colesterol [330]. Respecto al grupo control, que recibió un suplemento de un aceite rico en ácido oleico, se encontró que el DHA y el aceite de pescado provocaron, en conjunto, una regulación diferencial de 35 proteínas hepáticas, principalmente implicadas en el metabolismo de las lipoproteínas y el estrés oxidativo. Sin embargo, sus efectos sobre el proteoma no fueron idénticos, y cuatro de las proteínas afectadas mostraron una respuesta diferente frente al DHA o al aceite de pescado.

El tercer estudio empleó las herramientas proteómicas para la identificación de las proteínas alteradas presentes en el suero de humanos adultos sanos tras el consumo de aceites de pescado, en comparación con la ingesta de ácido oleico [331]. Los datos obtenidos mostraron la eficacia de la ingesta de los aceites de pescado para disminuir los niveles de diez

proteínas en el suero, que se clasificaron principalmente como moduladores de la inflamación y/o del metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas.

Proteómica cuantitativa para estudiar el efecto de los polifenoles

De manera similar a los omega-3 de pescado, los polifenoles han sido objeto frecuente de estudio en el campo de la investigación nutricional, principalmente por sus reconocidas propiedades nutraceuticas, aunque también en este caso, un número pequeño de investigaciones incluyeron el enfoque proteómico en su análisis.

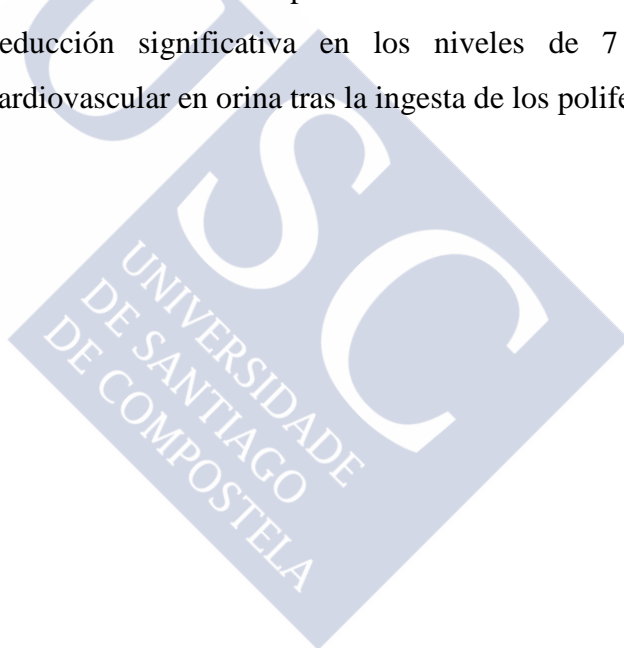
Entre ellas, se encuentran los estudios sobre el efecto de la inclusión de los polifenoles del té [332] o de la uva [146] en la prevención de los cambios inducidos por el consumo de dietas altas en grasa sobre el proteoma hepático en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, empleando respectivamente la cuantificación basada en geles de 2DE o el marcaje iTRAQ. Gracias a estos estudios, se encontró que tanto los polifenoles del té como de la uva pueden reducir la lipogénesis y aumentar la oxidación de ácidos grasos en el hígado, a través de la modulación de los niveles de proteínas hepáticas implicadas en estas rutas.

Dos estudios evaluaron la influencia de los polifenoles de uva en la prevención de la nefropatía diabética. En el primer estudio, el análisis basado en geles 2DE permitió demostrar la capacidad de los polifenoles de uva para contrarrestar los niveles de nueve proteínas renales, principalmente implicadas en el estrés oxidativo, la glicosilación y el metabolismo de los aminoácidos, que habían sido alterados por el efecto de la diabetes inducida con estreptozocina en ratas [333]. El segundo abordó el estudio empleando como modelo ratones diabéticos db/db y mediante el marcaje iTRAQ, encontró 113 proteínas renales alteradas por el tratamiento con los polifenoles de uva [334].

Adicionalmente, diversos estudios evaluaron el efecto de los polifenoles de uva sobre otras alteraciones relacionadas con la diabetes. En ratas diabéticas, obtenidas mediante inducción con estreptozocina, aplicando la metodología basada en 2D-DIGE se encontró que 15 proteínas en la aorta [335] y 7 proteínas en la retina [336] respondían al tratamiento con los polifenoles de uva. En ratas adultas, mediante el análisis con geles 2DE, se encontró que el tratamiento con estos compuestos ejercía un efecto neuroprotector, fundamentado en la normalización de los niveles de 13 proteínas presentes en el cerebro de estas ratas [337]. Por su parte, el marcaje iTRAQ permitió identificar 31 proteínas en los islotes del páncreas de ratas obesas Zucker que respondían al tratamiento con polifenoles de uva, limitando la síntesis y

secreción de insulina y modulando factores implicados en la apoptosis [338]. Asimismo, la metodología iTRAQ encontró que estos compuestos normalizaban, hasta alcanzar los valores del grupo control, los niveles de 139 proteínas en la aorta [339] y de 125 proteínas en el miocardio [340] de ratones diabéticos db/db.

Otros polifenoles como la quercetina fueron estudiados para determinar su potencial efecto preventivo sobre el cáncer de próstata. Mediante el empleo de la metodología 2D-DIGE, se encontró que el tratamiento de células cancerígenas de la próstata con este flavonoide alteró los niveles de 10 proteínas, que se vincularon con la disminución de la viabilidad y la proliferación celular [341]. Finalmente, un estudio abordó el efecto que el consumo de una bebida rica en polifenoles ejerce sobre la concentración de péptidos biomarcadores de enfermedad cardiovascular presentes en la orina de humanos. Empleando para el análisis la combinación de la electroforesis capilar con identificación de los péptidos por MS, se encontró una reducción significativa en los niveles de 7 polipéptidos biomarcadores de enfermedad cardiovascular en orina tras la ingesta de los polifenoles [342].





III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Alteraciones metabólicas tales como obesidad, resistencia a insulina, hipertensión o dislipidemia, que en su conjunto componen el llamado síndrome metabólico, son factores de riesgo determinantes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y de diabetes tipo 2, y se han convertido en principales problemas de salud en los países desarrollados.

La elevada incidencia de estas alteraciones deriva, entre otras causas, del consumo de la denominada “dieta occidental”, que se caracteriza por un desequilibrio en la proporción de ácidos grasos omega-6 y omega-3, en favor de los primeros, un incremento en el consumo de calorías, de grasas saturadas y grasas *trans* así como un aumento en la ingesta de colesterol y azúcares refinados.

Sin embargo, la complejidad de la interacción entre dieta y metabolismo y el origen multifactorial de los trastornos dificultan en gran medida su estudio, lo que ha propiciado que todavía se desconozcan los mecanismos exactos que rigen la aparición y la progresión de estas alteraciones metabólicas inducidas por la dieta.

En este sentido, merece una mención especial la investigación orientada al estudio de los mecanismos relacionados con el estrés oxidativo, descrito como un factor clave que vincula la dieta con la aparición y la progresión de alteraciones metabólicas. Su modulación por parte de los distintos componentes de la dieta y su influencia sobre la homeostasis redox *in vivo*, se sitúan entre los principales retos a los que se enfrenta la investigación en el campo de la nutrición y la salud. En concreto, uno de los aspectos más desconocidos es el efecto del estrés oxidativo sobre la modulación específica del estado redox de las proteínas del organismo, pese a que estas biomoléculas son dianas principales de las especies reactivas *in vivo*.

El proteoma de un sistema biológico es un reflejo directo de su estatus y los cambios que se producen el mismo determinan, en gran medida, la respuesta del organismo ante diferentes perturbaciones. En consecuencia, la caracterización del estado oxidativo de las proteínas es un aspecto fundamental que debe ser abordado por la investigación nutricional para la identificación de las rutas bioquímicas implicadas en las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta, con el objetivo último de diseñar estrategias nutricionales adecuadas que puedan emplearse tanto en la prevención como el tratamiento de estas alteraciones. Numerosos componentes bioactivos presentes en los alimentos se han sugerido como promotores de efectos beneficiosos en la prevención de alteraciones metabólicas, entre los que cabe destacar los omega-3 PUFAs de origen marino (EPA y DHA).

El presente trabajo de investigación abordará el estudio de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta enfocado desde la perspectiva de las proteínas celulares, empleando para ello herramientas proteómicas que permitan determinar el estado oxidativo de la proteínas y la identificación de aquellas proteínas que resulten afectadas por la dieta, tratando de relacionarlas con las rutas bioquímicas de las que forman parte y que podrían estar implicadas en la aparición y desarrollo de las alteraciones. Asimismo, la investigación evaluará el efecto que sobre el proteoma redox puede ejercer el consumo de los PUFA omega-3 de cadena larga, y en especial los omega-3 PUFAs de origen marino, en la prevención del daño oxidativo ligado a las alteraciones metabólicas. Finalmente, se analizará el efecto de los omega-3 PUFAs de origen marino sobre la regulación de los niveles de las proteínas celulares y se estudiará su acción combinada con el poder antioxidante aportado por la inclusión en la dieta de un posible sinergista de los omega-3 PUFAs, como pueden ser los polifenoles de uva.

Por todo ello, el objetivo global de esta tesis doctoral será la determinación de los mecanismos moleculares implicados en la aparición y la progresión de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta, así como el descubrimiento de proteínas diana que permitan el diseño de estrategias específicas encaminadas al tratamiento de dichas alteraciones.

La consecución de este objetivo global requiere el planteamiento de los siguientes objetivos parciales:

1. La caracterización del perfil de carbonilación proteica asociado al consumo de los diferentes PUFAs de la dieta (ω -6 LA, ω -3 ALA, ω -3 EPA y ω -3 DHA), utilizando para ello un modelo animal al que se le administrarán alternativamente, aceite de soja, con una elevada proporción en ω -6 LA, aceite de lino, con una elevada proporción en ω -3 ALA, o tres diferentes mezclas de aceite de pescado, todas con una elevada proporción en ω -3 EPA y DHA, pero con diferentes proporciones relativas de estos PUFAs. En concreto, se ensayarán las proporciones de EPA:DHA 1:1, 2:1 ó 1:2. Este diseño experimental permitirá evaluar el posible efecto protector que los PUFAs marinos pueden ejercer sobre el daño oxidativo de las proteínas *in vivo*, identificar las proteínas diana específicas que puedan explicar el efecto beneficioso sobre la prevención de alteraciones metabólicas así como determinar si la proporción relativa de EPA y DHA en la dieta condiciona su efecto beneficioso a nivel metabólico.

2. La caracterización del perfil de carbonilación proteica asociado a las alteraciones metabólicas presentes en un modelo animal genético de síndrome metabólico. Se identificarán las proteínas específicas cuyo estado de oxidación se muestre alterado como consecuencia de las alteraciones metabólicas presentes en el modelo animal y se determinarán, por tanto, las rutas bioquímicas afectadas.

3. La caracterización del perfil de carbonilación proteica asociado a las alteraciones metabólicas inducidas en un modelo animal tras el consumo a largo plazo de una dieta elevada en grasas saturadas y en azúcares refinados. Se identificarán las proteínas diana específicas cuyo estado de oxidación se muestre afectado como consecuencia del consumo de una dieta inductora de alteraciones metabólicas y se determinarán las rutas bioquímicas implicadas y que condicionen la aparición y el desarrollo de las alteraciones metabólicas presentes en el modelo animal.

4. La determinación del efecto que ejerce el consumo de EPA y DHA sobre la regulación del nivel de las proteínas celulares, así como la posible modulación de dicho efecto por la presencia de antioxidantes como los polifenoles de uva. Se evaluará el comportamiento de estos compuestos bioactivos cuando son administrados a un modelo animal alimentado como base con una dieta sana o con una dieta inductora de alteraciones metabólicas. Se procederá a identificar las proteínas diana y las rutas bioquímicas implicadas que permitan caracterizar su posible efecto protector frente a la aparición o la progresión de alteraciones metabólicas.



IV. RESULTADOS

CAPÍTULO 1
PUBLICACIÓN

**Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with
marine ω 3 PUFAs**

**Lucía Méndez, Manuel Pazos, José M. Gallardo, Josep L. Torres, Jara
Pérez-Jiménez, Rosa Nogués, Marta Romeu and Isabel Medina**

Free Radical and Medicine 55 (2013) 8-20

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.004>

CAPÍTULO 2
PUBLICACIÓN

Targets of protein carbonylation in spontaneously hypertensive obese Koletsky rats and healthy Wistar counterparts: A potential role on metabolic disorders

Lucía Méndez, Manuel Pazos, Montserrat Giralt, M. Rosa Nogués, Jara Pérez-Jiménez, Josep L. Torres, J.M. Gallardo and Isabel Medina

Journal of Proteomics 106 (2014) 246-259

<http://dx.doi:10.1016/j.jprot.2014.04.036>

CAPÍTULO 3
PUBLICACIÓN

**Protein carbonylation associated to high-fat, high-sucrose diet
and its metabolic effects**

Lucía Méndez, Manuel Pazos, Eunice Molinar-Toribio, Vanesa Sánchez-Martos, José M. Gallardo, M. Rosa Nogués, Josep L. Torres and Isabel Medina

Journal of Nutritional Biochemistry 25 (2014) 1243–253

<http://dx.doi:10.1016/j.jnutbio.2014.06.014>

CAPÍTULO 4

Changes in liver proteins of rats fed both low and high-fat and sucrose diets induced by fish omega-3 PUFAs and their combination with grape polyphenols according to quantitative proteomics



4. CHANGES IN LIVER PROTEINS OF RATS FED BOTH LOW AND HIGH-FAT AND SUCROSE DIETS INDUCED BY FISH OMEGA-3 PUFAS AND THEIR COMBINATION WITH GRAPE POLYPHENOLS ACCORDING TO QUANTITATIVE PROTEOMICS

4.1. Abstract

This study considered the physiological modulation of liver proteins due to the supplementation with fish oils under two different dietary backgrounds: low- or high- fat and sucrose diets, and the effect of their combination with an antioxidant agent (grape polyphenols) which provides reducing power. For this scope, a quantitative proteomics approach based on the Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation methodology (iTRAQ)-coupled to nano-LC-MS/MS and complemented with 2D-DIGE analysis were used for determining the regulation of liver proteins exerted by the supplementation with fish oils, polyphenols or their combination of Wistar Kyoto rats in the two chosen dietary backgrounds. This experimental design was useful to investigate if the behavior of fish oils changes when the dietary background is modified and the possible synergy between fish oils and polyphenols. Results showed that the capacity of fish oils, polyphenols or their combination for down or up-regulating liver proteins depends on the dietary context. In the background of low-fat low-sucrose healthy diets, 10 different proteins were altered by the sum of three supplements, in opposite to the 45 altered proteins found in the high-fat high-sucrose unhealthy diets. Not only the total number of altered proteins was different, being higher in the unhealthy context, but also scarcely proteins were found altered in common between both contexts. However, in both situations, fish oils seemed to be the main force for regulating liver proteins, although the addition of polyphenols was able to modulate some fish oils effects. Moreover, we provided evidence of the effect of fish oils and their combination with grape polyphenols for improving biochemical parameters and for reducing enzymes of hepatic lipogenesis and glycolysis, for enhancing fatty acid beta oxidation and insulin signaling and for the amelioration of endoplasmic reticule stress and protein oxidation when are included in an unhealthy diet.

Keywords: fish oils, grape polyphenols, HFHS diet, quantitative proteomics, iTRAQ, 2D-DIGE

4.2. Introduction

Nutrients have the ability to interact and modulate molecular mechanisms responsible for organism's physiological functions. For that, diet composition plays an influential role in the maintenance of human health and the progression of pathologic states [343]. It has been largely accepted that consumption of marine foods and their long-chain ω -3 fatty acids as well as intake of plant-based foods rich in bioactive compounds as grape polyphenols is involved in health promotion and disease risk reduction. In fact, fish oils and polyphenolic compounds are commonly used as nutraceutical products for both preventive and palliative strategies [137, 138].

Regular consumption of ω -3 PUFAs of marine origin, principally EPA and DHA have been implicated in the prevention and palliation of autoimmune disorders, diabetes and cardiovascular disease (CVD), principally due to their ability to decrease blood pressure and levels of insulin, triglycerides, cholesterol, free fatty acids or total lipids [344]. They modulate these parameters via different mechanisms: EPA and DHA can alter membrane fluidity, are substrates for enzymes including cyclooxygenase, lipoxygenase and cytochrome P450 and can regulate the expression of genes involved in lipid, protein and carbohydrates metabolisms [10, 345]. Marine omega-3 PUFA control gene expression by reducing the levels of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and the carbohydrate response element binding protein (ChREBP) or by direct interaction with at least 4 metabolic nuclear receptors: PPAR (peroxisome proliferator activated receptor), LXR (liver X receptor), HNF-4 α (hepatic nuclear factor 4) and farnesol X receptor (FXR). Also, these PUFAs have showed anti-inflammatory properties by inhibiting the nuclear factor kb (NF-kb) and rising to reduce cytokine production [110].

A potential role of marine omega-3 acting against oxidative stress, a key factor subjacent in mostly metabolic disorders, has been recently suggested as well [346]. Moreover, the composition of fish oil supplements in terms of the proportion of EPA and DHA seems to be clue for the action of these supplementations on metabolic disorders. Indeed, recent studies have demonstrated that a balanced proportion between EPA and DHA provides a higher reduction on cardiovascular disease (CVD) risk markers, oxidative stress parameters in healthy Wistar Kyoto rats and also in an animal model of metabolic syndrome (SHROB rats) [349, 350].

Despite the huge variety of the beneficial health effects above exposed for marine omega-3 supplementation, dietary EPA and DHA can lead to a high susceptibility to lipid oxidation under

high fat diet or obesity [351], physiological conditions known to prone oxidative stress [352]. On the other hand, lipid peroxidation products such as 4-hydroxynonenal (4-HNE) trigger fat accumulation [353], and proteasome dysfunction associated to oxidative stress compromises insulin sensitivity in human obesity [209]. The incorporation of antioxidants on diet is a common strategy to cope with lipid oxidation. Specially, natural polyphenolics are well-known for preventing the peroxidation of fish oils *in vitro* [354] and *in vivo* [140] conditions leading to an improvement on the intestinal absorption of omega-3 PUFA. In the last years, the consumption of grape polyphenols *per se* has been associated with a reduction of the risk of different diseases in several epidemiological studies [137]. The “French paradox” [136], i.e. the low prevalence of CVD in certain French regions with a high intake of saturated fats, has been put down to the consumption of red wine. Grape polyphenols include flavonoids of which flavan-3-ols and their oligomeric forms (proanthocyanidins) have been reported to exhibit several beneficial health effects by acting as antioxidant, anticarcinogen, cardioprotective, antimicrobial, antiviral, and neuroprotective agents [137]. Recently, it has been reported that grape polyphenols down-regulates SREBP1c and lipogenic enzymes in the liver of rats suffering metabolic syndrome [146].

Because different effects on health have been attributed to these bioactive compounds, a proteome-wide approach to map proteins from different pathways can provide a complementary and global vision. But to date, few studies have addressed protein regulation linked to fish oils (FO) [329] or polyphenols (PP) in liver rats [146].

The current study is aimed to better investigate the molecular mechanisms behind the beneficial action of the FO with high proportion of omega-3 PUFA (EPA and DHA) together with grape PP for the prevention and mitigation of metabolic disorders. Then, the experimental design includes rats supplemented with FO or PP or the combination of both into the background of healthy and unhealthy diets. A hepatic proteome analysis to map proteins which are targets of these bioactive components trying to deep into the effect on the metabolic pathways regulated by such proteins is presented. For such scope, liver cytosolic protein fractions from female Wistar Kyoto rats fed for 25 weeks isocaloric low-fat and low-sucrose (LFLS) diets (LFLS-control, LFLS-FO, LFLS-PP and LFLS-FO&PP) and liver cytosolic protein fraction from rats fed isocaloric high-fat and high-sucrose diets (HFHS) (HFHS-control, HFHS-FO, HFHS-PP and

HFHS-FO&PP) have been studied by iTRAQ-labeled coupled with nano LC-MS/MS and complemented with 2D-DIGE. To our knowledge, this is the first hepatic proteome analysis of the combined effect of fish oil and grape polyphenols in liver rats fed either healthy or unhealthy diets.

4.3. Materials and methods

4.3.1. Animals and experimental design

Fifty-six female Wistar Kyoto rats (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) weighing between 100–150 g and with an initial age between 4–6 weeks were housed in animal cages (n 2–3/cage) with a constantly regulated temperature (22 ± 2 °C), humidity ($50 \pm 10\%$) and light-controlled room (lights on 0630-1830).

To study the effect of fish oils or/and polyphenols on liver protein regulation under feeding low or high fat-sucrose diets, the rats ($n = 56$) were randomly assigned to one of two dietary groups: a LFLS group ($n = 28$) fed a low-fat and low-sucrose diet base on the reference diet Teklad Global 2014 (Harlan Teklad Inc., Indianapolis, IN, USA) and a HFHS group ($n=28$) fed a high-fat and high-sucrose diet base on the TD. 08811 diet (Harlan Teklad Inc).

Both groups were also divided in four dietary subgroups ($n = 7$): CONTROL (C), which fed a LFLS or HFHS diet supplemented with soybean oil; FISH OIL (FO), which fed a LFLS or HFHS diet supplemented with fish oils in a ratio of 1:1 EPA:DHA; POLYPHENOLS (PP), which fed a LFLS or HFHS diet supplemented with polyphenol extract from grape seed and finally; FISH OIL AND POLYPHENOLS (FO&PP), which fed a LFLS or HFHS diet supplemented with a combination of fish oil and polyphenol extract. EPA:DHA 1:1 oil was obtained by mixing appropriate quantities of the commercial fish oils AFAMPES 121 EPA (A.F.A.M.S.A., Vigo, Spain), EnerZona Omega 3 RX (Milan, Italy) and Oligen liquid DHA 80% (IFIGEN-EQUIP 98, SL, Barcelona, Spain). Soybean oil, obtained from unrefined organic soy oil (first cold pressing) was from Clearspring Ltd. (London, UK). The fatty acid composition of the oil supplements was previously determined [347]. Grape seed extract (GSE) Grajfnol[®] ($\geq 95\%$ proanthocyanidins, 85% oligomers) was from JF-Natural Product (Tianjin, China). The eight subgroups are shown in Table 1. The experimental diets were pelletized in-house by lyophilization from frozen emulsions in order to incorporate each supplement. All groups had *ad libitum* access water and food.

Table 1. Diet composition and experimental animal groups.

	Flour (g)		Oil (mL)		Polyphenol extract (mg) ^c	Macronutrients (% caloric value)			Total energy density (kcal/g)
	LFLS ^a	HFHS ^b	Soybean	EPA: DHA 1:1		Protein	Fat	Carbohydrate	
LFLS-C	100	-	1.9	-	-	19	19	62	3.0
LFLS-FO	100	-	-	1.9	-	19	19	62	3.0
LFLS-PP	100	-	1.9	-	88	19	19	62	3.0
LFLS-FO&PP	100	-	-	1.9	88	19	19	62	3.0
HFHS-C	-	100	2.4	-	-	15	51	34 ^d	5.0
HFHS-FO	-	100	-	2.4	-	15	51	34 ^d	5.0
HFHS-PP	-	100	2.4	-	109	15	51	34 ^d	5.0
HFHS-FO&PP	-	100	-	2.4	109	15	51	34 ^d	5.0

LFLS, low-fat low-sucrose ; HFHS, high-fat high-sucrose; C, control; FO, fish oil; PP, polyphenols; FO&PP, fish oil and polyphenols.

^a Low fat-low sucrose diet (Tekland Global 2014)

^b High fat-high sucrose diet (TD 08811)

^c Grape seed proanthocyanidin extract

^d 27% from sucrose

After 25 weeks of experiment, the rats were fasted overnight, anesthetized intraperitoneally with ketamine and xylazine (80 mg/kg and 10 mg/kg body weight respectively), and then killed by exsanguination. Liver and total abdominal fat, corresponding to the sum of epididymal, perirenal and mesenteric depots were excised, washed with 0.9% NaCl solution, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen upon sacrifice. Blood samples were collected by cardiac puncture on a tube with EDTA and plasma and erythrocyte samples were separated by centrifugation (850 g, 4°C, 15 min.). Plasma samples for protein oxidation measurement were supplemented with 5 mM PMSF. All samples were stored at -80 °C until analysis.

All the procedures followed the European Union guidelines for the care and management of laboratory animals and all efforts were made to minimize suffering. The pertinent permission for

this specific study was obtained from the CSIC (Spanish Research Council) Subcommittee of Bioethical Issues (ref. AGL2009-12 374-C03-03).

4.3.2. Biochemical measurements

Triglycerides, total cholesterol, LDL- and HDL-cholesterol were measured by spectrophotometric methods (SpinReact Kits, Girona, Spain) [355, 356]. The percentage of glycated hemoglobin (HbA1c), in the blood was determined according to Sharp et al. [357]. Adiposity index: $((\text{total abdominal fat} \times 100)/\text{body weight})$ and hepatosomatic index: $((\text{liver weight} \times 100)/\text{body weight})$ were also calculated. Plasma insulin concentrations were measured using a Rat/Mouse Insulin ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The level of protein oxidation in plasma and liver was measured following a method previously described [347]. Data were reported as mean and standard deviation (S.D.). Statistical analysis was performed by using the one-way analysis of variance with the IBM SPSS Statistics 22 software (Statsoft, Tulsa, OK) and means were compared by the Tukey's Post Hoc Test. Significant difference was set at $p < 0.05$.

4.3.3. Cytosolic liver protein isolation and pool creation

200 mg of liver were homogenized with an Ultra-Turrax high-performance disperser, in 25 volumes of 20 mM sodium phosphate, pH 6.0, 0.5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 10 $\mu\text{L/mL}$ of ProteoBlockTM protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific, Rockford, IL) (100 mM AEBSF HCl, 80 μM aprotinin, 5 mM bestatin, 1.5 mM E64, 2 mM leupeptin and 1 mM pepstatin A). Homogenized samples were centrifuged at 100000 g for 1 h at 4 °C and cytosolic fraction was recovered in the supernatants. Micro BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific) was used for measuring cytoplasmic [358].

For pool creation, 50 μg of cytosolic proteins extracted from each seven rats corresponding to the same experimental group, namely LFLS-C, LFLS-FO, LFLS-PP, LFLS-FO&PP, HFHS-C, HFHS-FO, HFHS-PP and HFHS-FO&PP, were pooled. Therefore, the eight final groups used for the quantitative protein analysis were in fact constituted by protein pools, corresponding to the mixture of same protein amount of 7 biological replicates.

4.4. Proteomics approaches to analyse the effect of FO and PP on liver cytosolic protein regulation

4.4.1. iTRAQ approach

4.4.1.1. Protein digestion of pooled samples

50 µg of protein from each condition was precipitated by methanol/chloroform method, to concentrate and purify the protein sample. The pellet was resuspended and denatured in 20 µL 6 M guanidine hydrochloride/100mM HEPES, pH 7.5, (SERVA Electrophoresis GmbH), reduced with 1 µL of 50 mM Tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP, AB SCIEX), pH 8.0, at 60°C for 30 min and followed by 2 µL of 200 mM cysteine-blocking reagent (methyl methanethiosulfonate (MMTS, Pierce) for 10 min at room temperature. Samples were diluted up to 120 µL to reduce guanidine concentration with 50 mM TEAB. Digestions were initiated by adding 2.5 µL (1 µg/µL) sequence grade-modified trypsin (Sigma-Aldrich) to each sample in a ratio 1:20 (w/w), which were then incubated at 37°C overnight on a shaker.

4.4.1.2. Peptide labelling

To evaluate the effect of FO or PP or both on liver protein regulation in the two different dietary backgrounds (LFLS and HFHS), two independent iTRAQ experiments were performed. The first one was made to analyse the effects of FO, PP and both into the context of isocaloric LFLS healthy diets using the commercial reference chow-fed group supplemented with soybean oil (LFLS-C) as control group. The second one was made to analyse these effects into the context of isocaloric HFHS unhealthy diets, using the commercial HFHS chow-fed group supplemented with soybean oil (HFHS-C) as control group.

In each iTRAQ experiment, the resulting peptides of tryptic digestion were labelled using iTRAQ 4-plex kit (AB SCIEX, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions as follows: LFLS-C, tag-114; LFLS-FO, tag-115; LFLS-PP, tag-116 and LFLS-FO&PP, tag-117, for the first LFLS experiment; and HFHS-C, tag-114; HFHS-FO, tag-115; HFHS-PP, tag-116 and HFHS-FO&PP, tag-117, for the second HFHS experiment (Table 2).

Table 2. Experimental design for iTRAQ studies on the liver proteomics effects of different diet composition. 50 µg of protein liver pooled extracts from rats fed one of the different kinds of LFLS or HFHS diets were labelled using iTRAQ 4-plex kit according to the manufacturer's instructions.

iTRAQ-tag	iTRAQ-LFLS	iTRAQ-HFHS
114	LFLS-C	HFHS-C
115	LFLS-FO	HFHS-FO
116	LFLS-PP	HFHS-PP
177	LFLS- FO&PP	HFHS- FO&PP

After labelling, the samples were pooled, dried and desalted using a SEP-PAK C18 Cartridge (Waters). Finally cleaned tryptic peptides were evaporated to dryness and stored at –20°C for further analysis.

4.4.1.3. Nano-LC and MS analysis

A 2 µg aliquot of the resulting mixture was subjected to nano LC ESI-MSMS analysis using a nano liquid chromatography system (Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus, AB SCIEX, Foster City, CA) coupled to high speed Triple TOF 5600 mass spectrometer (AB SCIEX, Foster City, CA) with a Nanospray III source. The analytical column used was a silica-based reversed phase column C18 ChromXP 75 µm × 15 cm, 3 µm particle size and 120 Å pore size (Eksigent Technologies, AB SCIEX, Foster City, CA). The loading pump delivered a solution of 0.1% formic acid in water at 2 µL/min. The nano-pump provided a flow-rate of 300 nL/min and was operated under gradient elution conditions, using 0.1% formic acid in water as mobile phase A, and 0.1% formic acid in acetonitrile as mobile phase B. Peptides with iTRAQ labels were separated using a 150 minutes gradient ranging from 2% to 90% mobile phase B (mobile phase A: 2% acetonitrile, 0.1% formic acid; mobile phase B: 100% acetonitrile, 0.1% formic acid). Injection volume was 5 µl.

Data acquisition was performed with a TripleTOF 5600 System (AB SCIEX, Concord, ON). Data was acquired using an ionspray voltage floating (ISVF) 2800 V, curtain gas (CUR) 20, interface heater temperature (IHT) 150, ion source gas 1 (GS1) 20, declustering potential (DP) 85 V. All data was acquired using information-dependent acquisition (IDA) mode with Analyst TF

1.5.1 software (AB SCIEX, USA). For IDA parameters, 0.25 s MS survey scan in the mass range of 350–1250 Da were followed by 15 MS/MS scans of 250 ms in the mass range of 100–1800 (total cycle time: 4.04 s). Switching criteria were set to ions greater than mass to charge ratio (m/z) 350 and smaller than m/z 1250 with charge state of 2–5 and an abundance threshold of more than 70 counts (cps). Former target ions were excluded for 20 s. IDA rolling collision energy (CE) parameters script was used for automatically controlling the CE.

4.4.1.4. Database searches and statistics

MS and MS/MS data obtained for pooled samples were processed using Analyst® TF 1.5.1 Software (AB SCIEX). The raw files in each experiments of peptides were analysed in triplicate by nano-LC-ESI-MS/MS. Raw data file conversion tools generated mgf files were independently searched against the *Rattus norvegicus* UniProtKB/Swiss-Prot database (2012/10) containing 27765 protein coding genes and their corresponding reversed entries using the Mascot Server v. 2.3.1 (Matrix Science, London, UK). Search parameters were set as follows: enzyme, trypsin; allowed missed cleavages, 1; fixed modifications, iTRAQ 4-plex (N-term and K) and beta-methylthiolation of cysteine; variable modifications, oxidation of methionine. Peptide mass tolerance was set to ± 25 ppm for precursors and 0.05 Da for fragment masses. The confidence interval for protein identification was set to $\geq 95\%$ ($p < 0.05$) and only peptides with an individual ion score above the 1% False Discovery Rates (FDR) threshold were considered correctly identified. Only proteins having at least two quantitated peptides were considered in the quantitation. A 5% quantitation FDR threshold was estimated to consider the significant differentially expressed proteins.

4.4.2. 2D-DIGE approach

4.4.2.1. DIGE experimental design

Differential protein regulation among four pooled HFHS groups was evaluated by DIGE. Two or three technical replicates were performed in this study. 25 μg of each protein sample solubilized in standard cell lysis buffer were randomly labelled either with Cy3 or Cy5 Dyes. The experimental design (Table 3) determined that none of the differences observed was due to preferential labelling. The mixed internal standard methodology was used in this experiment. For

this purpose, the internal standard was prepared by pooling equal amounts of proteins—(6.25 µg) from each pooled group in the experiment and labelled with Cy2 Dye.

Table 3. Experimental design for 2D-DIGE study on the liver proteomics effects of different diet composition. 25 µg of protein liver pooled extracts from rats fed one of the different kinds of HFHS diets was labeled with 200 pmoles of the indicated CyDye, mixed together as shown on 2D gels.

GEL NUMBER	Cy2 Standard	Cy3	Cy5
1	HFHS-C+FO+PP+FO&PP	HFHS-C	HFHS-FO
2	HFHS-C+FO+PP+FO&PP	HFHS- FO&PP	HFHS-C
3	HFHS-C+FO+PP+FO&PP	HFHS-C	HFHS-PP
4	HFHS-C+FO+PP+FO&PP	HFHS-FO	HFHS- FO&PP
5	HFHS-C+FO+PP+FO&PP	HFHS-PP	HFHS- FO&PP

Additionally to the comparisons of HFHS-FO, -PP and -FO&PP with regards to control, the 2D-DIGE experimental design also allowed the realization of the rest of comparisons among the four different diets, i.e., HFHS-FO vs. -PP or -FO vs. -FO&PP or -PP vs. -FO&PP and then, to add information to the iTRAQ results.

4.4.2.2. 2D-DIGE separation

Proteins were labelled according to the CyDyes manufacturer (GE Healthcare). Briefly, 25 µg of cytosolic protein liver extracts for each pool (HFHS-C, -FO, -PP, -FO&PP) were minimally labelled with 200 pmol of the N-hydroxysuccinimide esters of Cy3 or Cy5 fluorescent cyanine dyes on ice in the dark for 30 min. All experiments comprised an internal standard containing equal amounts of each protein pools of HFHS dietary intervention, which was labeled with Cy2 dye. The labelling reaction was quenched with 1 µL of 10 mM lysine on ice for 10 min in the dark. The individual pools and the internal standard protein samples were combined in pairs as shown in Table 2 and run in a single gel (75 µg total proteins). Protein extracts were diluted volume to volume in Rehydration Buffer 2X (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 20 mM DTT 1,0% carrier ampholites pH 3-11NL,) up to final volume of 100 µL, and applied by Cup Loading to 24 cm IPG strips pH 3-11 NL (GE Healthcare) previously rehydrated with 440 µL of Rehydration Buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0,5% carrier ampholites pH 3-11NL,

1,2% DeStreak). The first dimension was run at 0.05 mA/IPG strip in the IPGphor IEF System (GE Healthcare) following a voltage increase in 5 steps: 300 V/h for 3h, linear gradient to 1000V in 6h, linear gradient to 8000 V in 3h, 8000 V/h until 64000 V/h were reached. After the first dimension, strips were equilibrated in the dark with SDS Equilibration Buffer (50 mM Tris pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, traces of bromophenol blue) containing 1% (w/v) DTT for 15 min and thereafter in SDS Equilibration Buffer containing 4% (w/v) iodoacetamide for 15 additional min. Then the proteins were separated on home-casted 12.5% Tris–glycine gels using an Ettan Dalt Six device (GE Healthcare) at 20°C until the tracking dye had migrated off the bottom of the gel.

4.4.2.3. Image acquisition and analysis

After electrophoresis, the gels were scanned with a Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare) at 100 μ m resolution using appropriate wavelengths and filters for Cy2, Cy3 and Cy5 dyes. Relative protein quantification across pools was performed using DeCyder software v 7.0. First, a Differential In-gel Analysis (DIA) module was used to co-detect the 3 images of a gel (internal standard and two samples) to measure accurate spot ratios of the Cy3 and Cy5 spot volumes referring to the standard Cy2 volume on each gel. Background subtraction, quantification and normalization were automatically applied with low experimental variation. Then those images individually processed with the DIA module were matched between gels with the Biological Variation Analysis (BVA) module, using the internal standard for gel-to-gel matching. BVA revealed the differences between experimental groups across all the gels. Each difference was calculated as average ratios for each spot (≥ 1.5 or ≤ -1.5 , were considered protein of interest). The Student's t test was used to compare average ratios for each spot between pooled groups. P values less than 0.05 were considered significant.

After imaging for CyDye components and DeCyder analysis, the gels were fixed in 10% methanol, 7% acetic acid for 30 min and then incubated overnight in the dark with Sypro Ruby (Molecular Probes). Sypro Ruby images were acquired on the same imager. For picking-up of the spots, the Sypro image was compared to the Master gel with DeCyder software, which translate individual coordinates for each spot of interest to the Sypro gel for automatically picking-up of

the spots by the Spot Picking Robot (GE Healthcare). The gel was re-imaged after spot cutting out to ensure accurate protein excision.

4.4.2.4. In-gel protein automatic digestion and protein identification

After picking-up of the spots of interest, tryptic digestions were made by using an automatic protein digester (Proteiner DP, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Protein identification of each spot of interest was performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using an AB Sciex 4800 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer. A 0.8 μ L aliquot of each peptide mixture was deposited onto a 384-well OptiTOF™ Plate (AB SCIEX, Foster City, CA) and allowed to dry at room temperature. A 0.8 μ L aliquot of matrix solution (3 mg/mL α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid in MALDI solution) was then deposited onto dried digest and allowed to dry at room temperature.

For MALDI-TOF/TOF analysis, samples were automatically acquired in positive ion reflector mode (the ion acceleration voltage was 25 kV to MS acquisition and 2 kV to MS/MS) using the 4000 Series Explorer Software v3.6. PMF and MS/MS fragment ion spectra were smoothed, corrected to zero baseline and internally calibrated with the mass signals of trypsin autolysis ions. To submit the combined PMF and MS/MS data to MASCOT software v.2.3.1 (Matrix Science, London, UK), GPS Explorer v4.9 was used, searching in the previous protein database from Uniprot/Swiss-Prot. The following search parameters were used: enzyme, trypsin; allowed missed cleavages, 1; carbamidomethyl cysteine as fixed modification; variable modifications, oxidation of methionine; mass tolerance for precursors was set to ± 50 ppm and for MS/MS fragment ions to ± 0.3 Da. The confidence interval for protein identification was set to $\geq 95\%$ ($p < 0.05$) and only peptides with an individual ion score above the identity threshold were considered correctly identified.

4.4.5. Gene ontology (GO) and network analysis

The final list of proteins differentially regulated by treatments was submitted to PANTHER program (<http://www.pantherdb.org/>), for the classification based on two main types of annotations: protein class and biological process. Network analysis was performed submitting the proteins of interest to the STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) software

(v.9.0) (<http://string-db.org/>). A confidence score was fixed to 0.4 (medium level). Cluster networks were created using the MCL algorithm which is included in the STRING website and a value of 2 was selected for all the analyses.

4.5. Results

4.5.1. Outcomes under isocaloric LFLS diets

4.5.1.1. Biochemical parameters

The results shown in Table 4 indicated that supplementation with FO, PP and FO&PP of rats fed LFLS diets, significantly altered the adiposity index, the free fatty acid levels in plasma and the oxidation indexes of both plasma and liver proteins. As regards to control, FO, FO&PP and specially PP increased abdominal fat percentage of the rats, however the FFA levels tended to be reduced, more significantly under the combination of FO&PP. Accordingly to their antioxidant behavior, PP supplementation reduced significantly protein oxidation indexes in plasma and liver and also ameliorate albumin protein oxidation when they were added in combination with FO. The rest of parameters did not show significant differences among groups for the rest of biochemical and biometrical parameters analysed.

Table 4. Body measurements and biochemical parameters in rats fed LFLS or HFHS diets.

	LFLS-C (n=7)	LFLS-FO (n=7)	LFLS-PP (n=7)	LFLS- FO&PP (n=7)	HFHS-C (n=7)	HFHS-FO (n=7)	HFHS-PP (n=7)	HFHS- FO&PP (n=7)
OBESITY								
Weight Increase (%)	83.8(22.1) ^a	92.9(21.3) ^a	81.4(11.6) ^a	88.8(23.2) ^a	101.8(16.9) ^a	114.9(20.3) ^a	93.6 (14.4) ^a	117.4(20.6) ^a
Food intake (g/day)	14.2(0.3) ^a	14.3(0.4) ^a	14.1(0.4) ^a	15.1(0.4) ^a	11.4(0.3) ^a	11.6(0.3) ^a	11.2 (0.2) ^a	11.2(0.2) ^a
Energy intake (kcal/g day)	44.2(0.8) ^a	44.4(1.3) ^a	43.6(1.1) ^a	46.7(1.1) ^a	54.7(1.3) ^a	55.8(1.2) ^a	53.9 (1.2) ^a	53.7(1.3) ^a
Adiposity index (%) [†]	1.92(0.48) ^a	3.99(1.20) ^b	6.17(3.02) ^b	4.84(1.19) ^b	6.62(3.95) ^a	6.12(2.62) ^a	4.98 (1.31) ^a	4.32(1.54) ^a
Hepatosomatic index (%) [‡]	2.6(0.5) ^a	2.7(0.2) ^a	2.7(0.2) ^a	2.7(0.2) ^a	2.4(0.1)a	2.4(0.1)a	2.3 (0.1)a	2.7(0.4)a
LIPID PROFILE								
Total cholesterol (mmol/L)	4.3(1.0) ^a	3.8(0.2) ^a	4.4(0.3) ^a	3.5(0.4) ^a	3.5(0.3) ^a	2.7(0.5) ^b	3.7(0.3) ^a	2.8(0.3) ^b
Triglycerides (mmol/L)	1.5(0.4) ^a	1.7(0.4) ^a	1.9(0.3) ^a	1.6(0.3) ^a	1.3(0.2) ^a	1.6(0.3) ^a	2.2(0.2) ^b	1.5(0.3) ^a
FFA (µg/mL)	212.0(22.1) ^a	164.2(32.0) ^{ab}	166.6(24.2) ^{ab}	147.5(30.0) ^b	180.7(24.2) ^{ab}	140.2(15.9) ^{ac}	187.8(4.5) ^b	136.6(25.2) ^c
TFA (µg/mL)	2982.0(772.8) ^a	2873.8(343.7) ^a	3426.7(338.5) ^a	2770.9(438.6) ^a	2442.2(245.0) ^a	2233.0(425.4) ^a	3764.9(374.1) ^b	2101.4(231.1) ^a
GLUCOSE METABOLISM								
HbA1c (%)	3.24(0.15) ^a	3.15(0.10) ^a	3.25(0.22) ^a	3.35(0.20) ^a	3.25(0.14) ^a	3.14(0.12) ^a	3.11(0.12) ^a	2.70(0.70) ^a
Plasma insulin (pmol/L)	0.9(0.3) ^a	1.2(0.6) ^a	1.2(0.5) ^a	1.5(0.5) ^a	2.0(0.6) ^a	1.6(0.4) ^a	2.6(1.2) ^a	1.5(1.0) ^a
PROTEIN CARBOXYLATION INDEX								
Plasma Albumin (%)	36.79(2.62) ^a	43.19(4.06) ^a	28.05(1.92) ^b	34.32(9.14) ^{ab}	41.78(3.32) ^a	37.27(3.16) ^a	30.33(2.79) ^b	24.29(4.33) ^b
Liver (%)	0.21(0.02) ^a	0.23 (0.02) ^a	0.17(0.03) ^b	0.23(0.02) ^a	0.31(0.03) ^a	0.25(0.03) ^{ab}	0.31(0.07) ^{ab}	0.19(0.02) ^b

[†]Adiposity index: (total abdominal fat × 100)/body weight.[‡]Hepatosomatic index: (liver weight × 100)/body weight.

Results are means (standard deviation); n, number of rats. Values with different superscripts indicate significant differences (p<0.05) among the groups inside the same dietary background (LFLS or HFHS).

4.5.1.2. Protein identification and quantification in cytosolic protein fraction of liver by iTRAQ analysis

The comparative proteomics analysis using iTRAQ 4-plex methodology evidenced different effects of the FO or PP or their combination (FO&PP) on the regulation of liver cytosolic proteins of rats fed LFLS diets.

Given the identification filters described in the Methods section, 1076 proteins were identified considering the sum of the total different proteins identified in each of the three technical replicates (which corresponding to seven biological replicates), which resulted in a FDR of 6.88%. As Fig.1 shown, 830 proteins (FDR 6.02%) were identified in the first technical replicate, 848 proteins (FDR 5.90%) were identified in the second one and 831 proteins (FDR 5.78%) were identified in the third one. Considering the 1076 whole different proteins, a total of 633 identified proteins were matched in all the three replicates, meanwhile 167 proteins were found in two replicates. Hence, the remained 276 identified proteins were found only in one of the individual replicates.

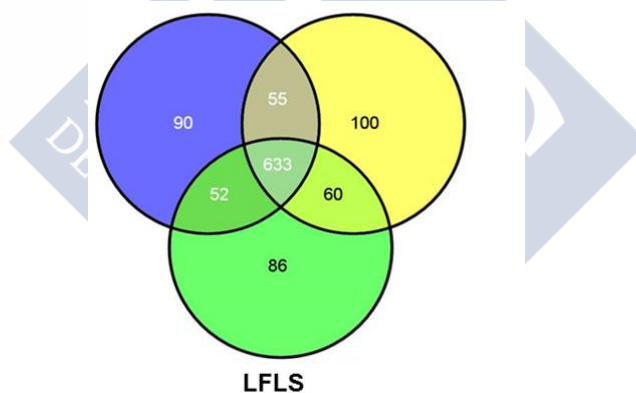


Figure 1. Venn´ diagram for representing the protein identified overlapping among the three replicates performed in the iTRAQ-LFLS experiment.

Regarding quantification, a total of 692 proteins could be successfully quantified considering all the three replicates. To strengthen the conclusions of this work, only the proteins which were quantified in two or three replicates were employed for the analysis, being finally 569 proteins, which suppose the 82% of the total quantified proteins computed. Among these 569

proteins, the most of them (477 proteins, almost the 84%) were quantified in each of the three replicates, reinforcing the quantification confidence.

4.5.1.3. Up and down regulation of liver proteins by iTRAQ analysis

As Table 5 shows, the supplementation with FO caused a significant alteration in 6 proteins versus the control group, with a minimal reduced of 21% and a minimal increase of 40% (FDR 3.1%). Among them, three proteins involved in carbohydrate metabolism were significantly down-regulated: the glycolytic fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA) which is a key protein of fructose metabolism (-35%), the protein Zadh2 (ZADH2), which is an oxidoreductase belonging to zinc-containing alcohol dehydrogenase family (-22%) and the mitochondrial glyoxalase domain-containing protein 4 (GLOD4) (-29%).

Protein and cellular amino acid metabolisms were also affected by FO supplementation. The T-complex protein 1 subunit beta (CCT2) a molecular chaperone, and the cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSAD), involved in sulfur amino acid metabolic process, were respectively down-regulated -21 and -25% by FO. Finally, the protein G3bp1 (G3BP1), involved in functions of localization/transport, was highly up-regulated by the FO rich diet (almost 40%).

The supplementation with PP changed the amount of 2 proteins (Table 5) versus the control group with a minimal reduced of 35% and a minimal increase of 39% (FDR 0.2%). As well as FO, PP supplementation significant reduced (more than the -36%) the cellular amount of the ALDOA. The second protein was a key protein in the alanine, aspartate and glutamate metabolism, the glutaminase (GLS2) which was reduced in more than -35%.

Finally, the combination of FO&PP altered 6 proteins (Table 5) versus the control group (with a minimal reduced of 24% and a minimal increase of 36%, FDR 4.4%), the same number but not exactly the same proteins altered by the supplementation with only FO. Considering the six altered proteins, one of them, ALDOA, from carbohydrate metabolism, was down-regulated in the combined FO&PP enriched diet and in the FO and PP diets, as well. Although FO&PP reduced the ALDOA amount in -32% did not display an additive effect, since the decrement was virtually the same than the exerted by FO or PP by their own.

Two proteins were down-regulated by FO and also down-regulated by the combination FO&PP. These proteins were GLOD4 related with carbohydrate metabolism (down-regulated -28%) and CSAD involved in amino acid metabolism (down-regulated -29%).

The combination FO&PP has shown three unique target proteins not affected in the other two diets: the long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1 (ACSL1), an enzyme involved in the lipid metabolism (down-regulated in a -29%), and two proteins involved in protein metabolism, the subunit beta of coatamer (COPB1), with localization/transport function (down-regulated in a -28%) and the tubulin-specific chaperone A (TBCA) (down-regulated -24%). This finding may suggest a synergistic effect of the joint intake FO and PP on ACSL1, COPB1 and TBCA.



Table 5. List of liver proteins differently regulated by FO, PP or FO&PP supplementation in the background of LFLS or HFHS diets found by using iTRAQ analysis. The protein relative abundance ratios are showed in the last six columns, corresponding to LFLS-FO/LFLS-C, LFLS-PP/LFLS-C, LFLS-FO&PP/LFLS-C, HFHS-FO/HFHS-C, HFHS-PP/HFHS-C and HFHS-FO&PP/HFHS-C and were calculated from the averages of three technical replicates (each from a pool of seven animals) from each sample group. Only proteins identified at FDR<1% were considered for quantitative analysis.

Identification	UniProt code	Gene name	Function or biological process	EFFECT ON LFLS-C			EFFECT ON HFHS-C		
				FO	PP	FO&PP	FO	PP	FO&PP
LIPID METABOLISM									
Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	P23965	Eci1	Fatty acid β-oxidation	1,31	0,91	1,35	1,34	1,03	1,49*
Acyl-coenzyme A oxidase	F1LNW3	Acox2	Peroxisomal FA β-oxidation	1,06	0,84	1,15	1,51*	1,12	1,48*
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	Q60587	Hadhb	Mitochondrial FA β-oxidation	1,00	0,91	1,03	0,85	0,79*	0,91
ATP-citrate synthase	P16638	Acly	Lipid biosynthetic process	0,85	1,02	0,79	0,67*	0,89	0,66*
			Tricarboxylic acid cycle						
Fatty acid synthase	P12785	Fasn	Fatty acid biosynthetic process	0,93	0,89	0,82	0,74*	0,99	0,71*
Farnesyl pyrophosphate synthase	P05369	Fdps	Cholesterol biosynthetic process	1,05	1,09	1,03	0,76*	1,03	0,78
Fatty acid-binding protein, epidermal	P55053	Fabp5	Lipid transport	1,02	1,40	0,83	0,60*	0,99	0,65*
Acyl-CoA-binding protein (ACBP)	P11030	Dbi	Lipid transport	1,19	1,29	1,19	0,66*	0,97	0,76*
Acyl-protein thioesterase 1 (ACP1)	P70470	Lypla1	Acyl-CoA Metabolism	1,05	1,15	1,12	0,67*	0,79*	0,94
			Protein lipidation						
60 kDa lysophospholipase	O88202	Aspg	Phospholipid and asparagine metabolic processes	n.q.	n.q.	n.q.	0,71*	0,91	0,92
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	P18163	Acs11	Fatty acid transport	0,89	0,74	0,71*	n.q.	n.q.	n.q.
Protein disulfide-isomerase A6	Q63081	Pdia6	Protein folding	1.01	1.02	1.08	0.76*	1.07	1.16
Tubulin-specific chaperone A	Q6PEC1	Tbca	Protein folding	1,04	1,06	0,76*	1,03	1,08	0,97
T-complex protein 1 subunit beta	Q5XIM9	Cct2	Protein folding	0,79*	0,96	0,90	0,93	0,91	0,84

Identification	UniProt code	Gene name	Function or biological process	EFFECT ON LFLS-C			EFFECT ON HFHS-C		
				FO	PP	FO&PP	FO	PP	FO&PP
Protein Nars	F1LML0	Nars	Protein translation	0,99	1,11	1,12	0,79*	0,94	0,80
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	Q4KM49	Yars	Protein translation	1,03	0,91	0,98	0,73*	0,89	0,81
Eukaryotic translation initiation factor 4B	Q5RKG9	Eif4b	Protein translation	n.q.	n.q.	n.q.	1,63*	1,04	1,47*
Dipeptidyl peptidase 1	P80067	Ctsc	Proteolysis	1,10	1,07	1,13	0,77*	0,81	0,89
Proteasome subunit beta type-8	P28064	Psmb8	Proteolysis	n.q.	n.q.	n.q.	0,79*	0,89	0,69*
GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein	P70552	Gchfr	Protein complex assembly Biological regulation	n.q.	n.q.	n.q.	0,81	0,85	0,74*
Protein Ppp2r1a	Q5XI34	Ppp2r1a	Protein dephosphorylation Biological regulation	0,92	0,89	0,88	0,83	0,88	0,76*
Glutaminase liver isoform, mitochondrial	P28492	Gls2	Glutamine metabolism and reactive oxygen species	0,81	0,65*	0,84	0,91	0,93	0,99
Coatomer subunit beta	P23514	Copb1	Protein transport	0,98	0,86	0,72*	0,78*	0,89	0,87
Actin-related protein 2	Q5M7U6	Actr2	Protein transport	0,90	0,88	0,89	1,36*	1,03	1,07
Nuclear transport factor 2	P61972	Nutf2	Protein transport	n.q.	n.q.	n.q.	0,80	0,77*	0,73*
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	Q9EQX9	Ube2n	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	0,95	1,06	0,94	0,82	0,87	0,76*
Cysteine sulfinic acid decarboxylase	Q64611	Csad	Sulfur amino acid metabolic process	0,75*	1,01	0,72*	1,00	1,00	1,08
L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	F1LMK6	Sds	Amino acid metabolism	0,85	0,75	0,82	0,79*	0,91	0,88

Identification	UniProt code	Gene name	Function or biological process	EFFECT ON LFLS-C			EFFECT ON HFHS-C		
				FO	PP	FO&PP	FO	PP	FO&PP
CARBOHYDRATE METABOLISM									
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	P85968	Pgd	Pentose phosphate shunt	1,06	1,13	0,99	0,77*	1,05	0,72*
Pyruvate kinase PKLR	P12928	Pklr	Glycolysis	0,97	1,05	0,90	0,80	1,01	0,74*
Protein Tsta3	B0BNN0	Tsta3	Glycogen metabolic process Cholesterol metabolic process	0,94	1,03	0,92	0,96	0,75*	0,89
Fructose-bisphosphate aldolase A	P05065	Aldoa	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,65*	0,64*	0,68*	1,09	0,99	0,94
Protein Zadh2	D4A264	Zadh2	Carbohydrate metabolism	0,78*	0,92	1,00	n.q.	n.q.	n.q.
Glyoxalase domain-containing protein 4	Q510D1	Glod4	Carbohydrate metabolism	0,71*	1,05	0,73*	1,07	0,96	1,03
MISCELLANEUS									
Protein G3bp1	D3ZYS7	G3bp1	Transport Ras protein signal transduction	1,40*	1,28	0,92	1,54*	1,10	1,17
Carbonic anhydrase 3	P14141	Ca3	Response to oxidative stress	1,14	1,05	1,12	1,45*	0,98	1,31
Catechol O-methyltransferase	P22734	Comt	Steroid hormone biosynthesis	1,03	1,14	0,99	0,76*	1,04	0,79
Lumican	P51886	Lum	Biological adhesion	n.q.	n.q.	n.q.	0,77*	0,82	0,77
Ferritin light chain 1	P02793	Ftl1	Ion binding/ferric ion binding	1,07	1,25	1,03	0,78*	0,81	0,79
Prothymosin alpha	P06302	Ptma	Nucleobase-containing compound metabolic process Immune system process	0,95	1,11	1,17	1,13	1,27	1,40*

Identification	UniProt code	Gene name	Function or biological process	EFFECT ON LFLS-C			EFFECT ON HFHS-C		
				FO	PP	FO&PP	FO	PP	FO&PP
Protein Ighm	F1LN61	Ighm	Antigen binding Immune system process	0,91	0,74	0,77	0,74*	0,84	0,94
UNCHARACTERIZED PROTEIN									
Protein LOC679748	D3ZE63	LOC686548	Predicted from sequence, “macrophage migration inhibition factor-like” Immune system process Pro-inflammatory cytokine	1,10	1,34	1,04	0,93	0,86	0,69*
Uncharacterized protein	M0R7Y9	-	Cellular component organization or biogenesis Actin binding	1,25	1,28	0,86	0,93	0,91	0,74*

* A value with a statistically significant difference (FDR<5% at quantification level) between LFLS-C or HFHS-C quantity and each diet supplemented with FO, PP or FO&PP quantity values. n.q.: no quantified

4.5.1.4. Functional information of differentially regulated proteins: gene ontologies and network analysis

PANTHER analysis revealed the presence of 8 different protein classes. About a 20% were chaperones and the rest classes included oxidoreductases, ligases, lyases, hydrolases, signaling molecules, nucleic acid binding and membrane traffic proteins.

With regard to their biological function, PANTHER revealed 3 main biological functions. A 66.7% of proteins were involved in metabolic processes (mainly carbohydrate, protein, cellular amino acid and lipid metabolism), 25.0% in localization/transport processes and 8.3% in cellular component organization or biogenesis processes.

STRING database analysis showed a network composed by 33 nodes (or proteins) and enriched in interactions or edges (62 interactions, but only one direct interaction between two proteins of interest: Copb1 and Cct2) (Fig. 2). The topological analysis of the network revealed the existence of five sub-networks, in concordance with the main biological functions. Three of the sub-networks were highly interconnected through Cct2, Cct6a, Tcp1 and Sphk1 from protein metabolism, Pfkfb3, Gapdh and ENSMUSG00000073212 from carbohydrate metabolism and Hras1, Nras, Caprin1 and Copb1 involved in transport and biological signaling. The lipid and cellular amino acid sub-networks were isolated to each other. Interestingly, Acs11 from lipid metabolism was closely related to Ppara and also to proteins involved in both lipid biosynthesis (Acadm and Acadl) and degradation (Hadhb, Dci and Derc1).

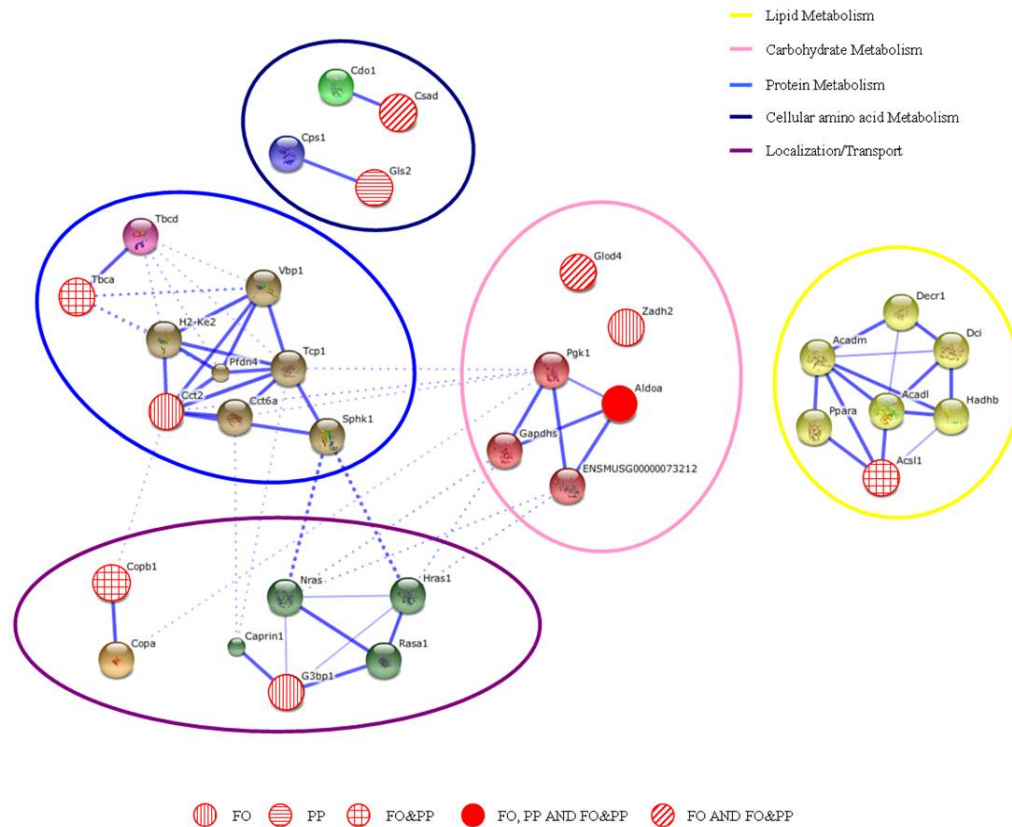


Figure 2. Biological network analysis of the deregulated protein by FO, PP and/or FO&PP supplementations in the LFLS background by using the STRING software. The proteins of interest were the 10 deregulated proteins from Table 5. Lines indicate the known interrelationships and stronger associations are represented by thicker lines.

4.5.2. Outcomes under isocaloric HFHS diets

4.5.2.1. Biochemical parameters

As table 4 shows, the HFHS diets supplemented with FO and FO&PP improved plasma lipid profile by reducing cholesterol and FFA levels as compared to HFHS-C and HFHS-PP diets. Also both supplements seemed to act on insulin resistance achieving lower values in plasma insulin than control and PP groups. Moreover, FO&PP tended to decrease the HbAc%, a parameter also related with insulin resistance. The combination of FO&PP significantly reduced plasma and liver protein oxidation as compared HFHS-C diet, although FO and PP tended to reduce these indexes as well. In general, the combination of FO&PP produced the best improvement of biochemical measurements under a HFHS diet. The rest of parameters did not

show significant differences among groups for the rest of biochemical and biometrical parameters analysed.

4.5.2.2. Protein identification and quantification in cytosolic fraction of liver by iTRAQ analysis

Considering the identification filters described the Methods section, the sum of protein identified in the three replicates was 1036 proteins, which resulted in a FDR of 6.95%. Individually, 820 proteins (FDR 5.85%) were identified in the first replicate, 832 proteins (FDR 5.77%) were identified in the second one and 804 proteins (FDR 5.97%) were identified in the third one. Among the 1036 total proteins, 628 proteins were identified in common in all the three replicates, other 164 proteins were found in two replicates and the rest, 244 proteins, were detected in only one replicate (Figure 3).

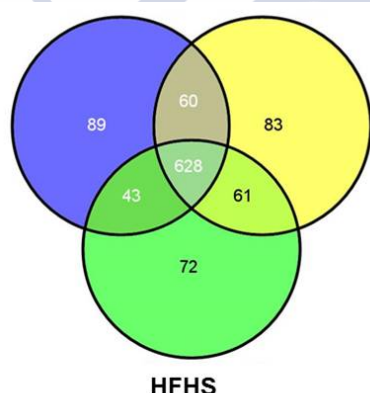


Figure 3. Venn´ diagram for representing the protein identified overlapping among the three replicates performed in the iTRAQ-HFHS experiment.

With regard to quantification and according to the set filters the sum of proteins which could be quantified in the three replicates was 678 proteins. Among these proteins, 448 proteins were quantified in common in the three replicates and 115 proteins were quantified at least in two of them. Therefore, more than the 83% of proteins could be quantified in at least two replicates and used for our study.

4.5.2.3. Up and Down Regulation of liver proteins by iTRAQ analysis

Quantitative iTRAQ analysis revealed a different effect of long time intake of FO or PP or a combination of both on liver proteins in the background of HFHS diet.

Under high-fat and high-sucrose fat feeding, 24 proteins were affected by FO supplementation versus the control group, with a minimal reduction of 23% and a minimal increase of 44% (FDR 4.9%). Results are showed in the table 4.

The 34% of altered proteins belonged to lipid metabolism. Among them, proteins belonging to lipid synthesis, such as the ATP-citrate synthase (ACLY) (-33%), the enzyme fatty acid synthase (FASN) (-27%) and the farnesyl pyrophosphate synthase (FDPS) (-24%), were down-regulated -33, -27 and -24%, respectively. Also, proteins involved in lipid transport were significantly down-regulated by FO, the epidermal fatty acid-binding protein (FABP5) (-40%) and the acyl-CoA binding protein (ACBP) (-34%). On the other hand, one protein related to lipid degradation, the peroxisomal acyl-CoA oxidase (ACOX2) was found to be strongly up-regulated (more than 50%) by FO.

One enzyme associated to the pentose phosphate pathway, therefore a key enzyme in both lipid and carbohydrate metabolisms, was significantly down-regulated by FO, the decarboxylating enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD) (-23%).

The acyl-protein thioesterase 1 (ACPI), involved in acyl-CoA metabolism and protein lipidation, and the 60 kDa lysophospholipase (ASPG), involved in phospholipid and asparagine metabolisms, were also down-regulated in -33 and -29%, respectively.

Other group of proteins significantly altered by FO belonging to protein and amino acid metabolism; indeed they constitute almost the 34% of differentially regulated proteins. These proteins were mainly involved in either protein translation (the protein Nars (NARS) and the cytoplasmic tyrosine-tRNA ligase (YARS) were respectively down-regulated -21 and -27%, and the eukaryotic translation initiation factor 4B (EIF4B) was up-regulated more than 63%) or protein degradation (proteasome subunit beta type-8 (PSMB8), dipeptidyl peptidase 1 light chain (CTSC) and L-serine dehydratase/L-threonine deaminase (SDS) were respectively down-regulated -21, -23 and -21%) or protein transport (the subunit beta of coatomer (COPB1), down-regulated -22%, the actin-related protein 2 (ACTR2) and the protein G3BP1, which were

respectively up-regulating 36% and 54%) or protein folding (the protein disulfide-isomerase A6 (PDIA6, down-regulated -24%).

We also found several proteins involved in diverse functions such as the liver response to oxidative stress (the enzyme carbonic anhydrase 3 (CA3) was increased in more than 45%), vitamin and steroid hormone metabolism (the catechol O-methyltransferase (COMT) was reduced -24%), biological adhesion (the lumican (LUM) was down-regulated -23%) and ferric ion binding (the light chain of ferritin (FTL1) was reduced in -22%). Moreover, we found the protein Ighm (IGHM), involved in immune system process, significantly reduced by FO (-26%).

The supplementation with PP changed the amount of 4 proteins versus the control group (Table 4) with a minimal reduction of 21% and a minimal increase of 33% (FDR 4.8%). The four proteins altered by PP were: two related to lipid metabolism, the subunit beta of the mitochondrial trifunctional enzyme (HADHB) (-21%) and ACP1 (-21%) that also was down-regulated by fish oils as mentioned before; one from protein metabolism, the nuclear transport factor 2 (NUTF2) (-23%) and finally, one from carbohydrate metabolism, the protein Tsta3 (tissue specific transplantation antigen P35B or TSTA3) (-25%).

The supplementation with FO&PP changed the level of 17 proteins versus the control group (Table 4), with a minimal reduction of 26% and a minimal increase of 46% (FDR 4.7%). The combination of FO&PP resulted in an important dysregulation of proteins related to lipid metabolism (40% of the altered proteins). Six of these proteins had showed a similar change (as previously mentioned) than only by the supplementation with FO: ACLY (-34%), FASN (-29%), FABP5 (-35%), ACBP (-24%), PGD (-28%) and ACOX2 (+48%). Additionally, FO&PP significantly up-regulated another protein involved in fatty acid beta-oxidation, the enoyl-Co delta isomerase 1 (ECI1), resulting in almost a 50% of increment respect to HFHS control group.

In agreement with the high number of proteins related with the protein and amino acid metabolisms which were found altered in FO, FO&PP showed a significant number of changes in these kind of proteins as well (almost the 40% of altered proteins). However, the proteins which resulted altered were not the same in both supplements. Only two proteins were altered in common by the two supplementations: the EIF4B which showed an increment of 47%, slightly lower than by effect of FO (63%), and the PSMB8, which showed a reduction of -31%, slightly higher than by effect of FO (-21%). The rest proteins of this subgroup appeared significantly

down-regulated uniquely by the FO&PP supplementation and were: the protein GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory (GCHFR) (-26%), involved in the protein complex assembly, the protein Ppp2r1a (phosphatase 2 (Formerly 2A), regulatory subunit A, alpha isoform) (PPP2R1A) (-24%) and the ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBE2N) (-24%), both involved in protein modification, and one protein (Uniprot code M0R7Y9) still uncharacterized (-26%). By using BLAST software, we found that this protein displays 100% homology with the putative thymosin beta-4-like protein 6, involved in actin binding. The last protein belonging to protein metabolism found down-regulated by FO&PP was the only protein found in common with the PP supplementation. That protein was the transporter NUTF2, which was slightly more reduced by FO&PP (-27%) than by only PP supplementation (-23%).

Regarding the carbohydrate metabolism, one of the glycolysis regulatory enzymes, the pyruvate kinase isozymes R/L (PKLR), suffered a significant reduction (-26%) as consequence of the FO&PP supplementation. Finally, two proteins involved in immune system process were found altered: the prothymosin alpha (PTMA), up-regulated 40%, and the protein LOC679748, down-regulated -31%. By using BLAST software, we found that this protein LOC679748 displays 96% of homology with the rat macrophage migration inhibition factor (MIF).

4.5.3. Analysis of 2D-DIGE images of rat liver of HFHS diet

2D-DIGE analysis was also performed on rats fed HFHS diets aiming to complement and reinforce the iTRAQ results. Our iTRAQ data revealed important effects of FO, PP and FO&PP supplementations against the unhealthy outcomes of HFHS diets. However, scarcely alteration of liver protein was found in LFLS-fed rats, so that we decide to perform the 2D-DIGE analysis with the rats fed one of the HFHS diets.

The analysis of gel images (Figure 4) of HFHS-fed rats revealed significant changes in the protein quantity of 8 spots (corresponding to 5 different proteins) identified between FO and control group. There were 15 spots (corresponding to 12 different proteins) changed when the FO&PP group was compared with control and only 1 change associated to the protein moesin (MSN) (51% increased by PP) when PP was compared to the control HFHS-C. Between FO and PP gels, there were 4 different spots (corresponding to 3 proteins) and between FO&PP and PP gels, 9 spots with different protein amount (corresponding to 8 different proteins). The

comparison between proteins in FO and FO&PP gels did not show any difference. Proteins deregulated are showed in the table 6.

As compared to HFHS-C, FO significantly down-regulated proteins involved in carbohydrate metabolism (the glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PDH) and the PKLR) and in cellular amino acid metabolic processes (the mitochondrial carbamoyl-phosphate synthase [ammonia] (CPS1), the argininosuccinate synthase (ASS1) and the homogentisate 1,2-dioxygenase (HGD)). Similar results were obtained from the comparison of the gels corresponding to FO and PP, in concordance with the slight differences found between PP and control. In fact, FO also significantly down-regulated G6PDH, PKLR, ASS1 and HGD as compared to PP. Moreover, the enzyme PGD was also down-regulated by FO when it was confronted with PP group.

When FO&PP gels were compared to HFHS-C, it has been revealed that the FO&PP significantly down-regulated proteins involved in lipid metabolism (ACLY, the bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase (BAAT) and the mitochondrial delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase (ECH1)), in carbohydrate metabolism (PGD and G6PDH), in cellular amino acid metabolic processes (CPS1, ASS1 and HGD), altered proteins from protein metabolism (up-regulated the 78 kDa glucose-regulated protein (HSPA5) and MSN and down-regulated the heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8)) and up-regulated the catalase (CAT) involved in cellular response to oxidative stress. Again, similar results were obtained when FO&PP were compared with PP gels. Likewise, the combination of FO&PP also reduced the protein quantity of ACLY, PGD, G6PDH, ASS1, HGD and HSPA8. Moreover, the enzyme PKLR was also found down-regulated by FO&PP as compared with PP group.

The results of the two complementary quantity proteomics approaches, iTRAQ and 2D-DIGE, were in concordance in terms of the metabolic pathways altered and also in the trends in the protein changes and they will be discussed in common in the Discussion section.

It should be noted that three proteins were overlapping between both methods: PGD, ACLY and PKLR. Both DIGE and iTRAQ data found that that PGD and ACLY were significantly down-regulated by the combination of FO&PP as compared with the HFHS control. Additionally, DIGE demonstrated that these proteins were also reduced by the mix with respect to PP-supplemented diet. Similarly, PKLR was also found reduced in both methods due to

FO&PP supplementation, although with DIGE only when FO&PP were compared with PP gels, a group which did not show differences with HFHS-C in the spots corresponding to PKLR.

ACLY and PGD also were found down-regulated by FO in comparison with HFHS-C in the iTRAQ analysis. In contrast, DIGE did not find differences among group for ACLY and for PGD only when it was confronted to PP group. However, because of neither differences between FO and FO&PP nor between PP and HFHS-C gels were found in ACLY and PGD protein spots, the tendency to down-regulation by FO with regards to control could be assumed. DIGE also found down-regulated two spots identified as PKLR by FO regarding to HFHS-C and PP gels. However iTRAQ did not find significant altered PKLR by FO. Although the total protein amount of PKLR was likely reduced by FO supplementation, in view of DIGE results it is also possible that FO provoked changes at posttranslational level which are easier to detect with DIGE methodology.

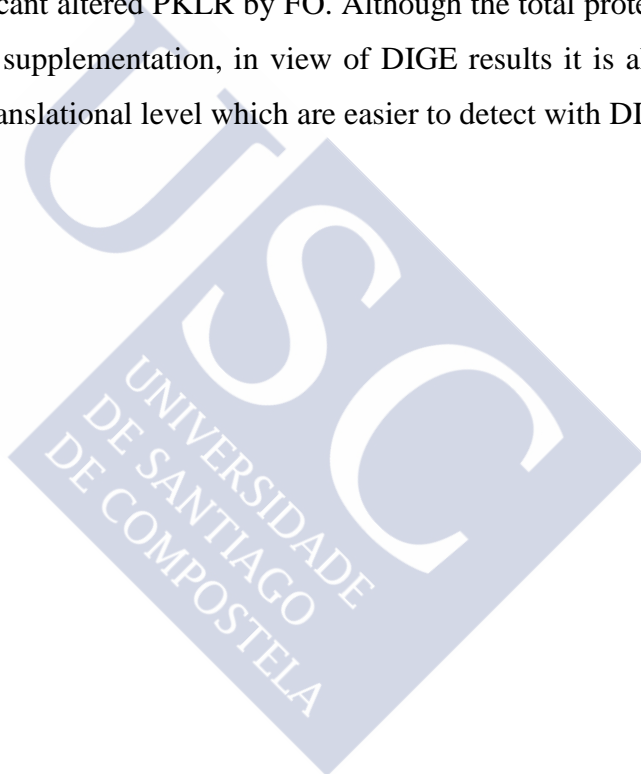


Table 6. List of liver proteins differently regulated by FO, PP or FO&PP supplementation in the background of HFHS diets found by using 2D-DIGE analysis. Protein spots with a significant ($p < 0.05$) value < -1.5 or > 1.5 in relative abundance between diets are listed in the table.

SSP	Identification	Gene name	Uniprot code	MASCOT Score	Matches	EFFECT OF FO		EFFECT OF FO&PP	
						ON HFHS-C	ON HFHS-PP	ON HFHS-C	ON HFHS-PP
LIPID METABOLISM									
770	ATP-citrate synthase	Acly	P16638	62	7	n.s.	n.s.	-2,31	-1,63
1983	Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase	Baat	Q63276	137	10	n.s.	n.s.	-1,5	n.s.
2627	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Ech1	Q62651	179	10	n.s.	n.s.	-1,62	n.s.
CARBOHYDRATE METABOLISM									
1825	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Pgd	P85968	64	5	n.s.	-1,64	-1,55	-1,71
1580	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PDH)	G6pdx	P05370	221	14	-1,71	n.s.	-2,01	-1,64
1585	Pyruvate kinase PKLR	Pkrl	P12928	156	12	-1,74	-1,8	n.s.	-1,51
1606	Pyruvate kinase PKLR	Pkrl	P12928	60	4	n.s.	-1,55	n.s.	n.s.
CELLULAR AMINO ACID METABOLISM									
741	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	Cps1	P07756	102	10	-2,47	n.s.	-1,95	n.s.
762	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	Cps1	P07756	95	11	-3,72	n.s.	n.s.	n.s.
2055	Argininosuccinate synthase	Ass1	P09034	239	20	-2,65	-2,68	-2,6	-2,62
1963	Argininosuccinate synthase	Ass1	P09034	507	24	n.s.	n.s.	-1,67	n.s.
1825	Homogentisate 1, 2-dioxygenase	Hgd	Q6AYR0	62	6	-1,54	n.s.	-1,7	-1,58

SSP	Identification	Gene name	Uniprot code	MASCOT Score	Matches	EFFECT OF FO		EFFECT OF FO&PP	
						ON HFHS-C	ON HFHS-PP	ON HFHS-C	ON HFHS-PP
PROTEIN METABOLISM									
1208	Moesin	Msn	O35763	66	3	n.s.	n.s.	1,58	n.s.
1199	78 kDa glucose-regulated protein	Hspa5	P06761	164	11	n.s.	n.s.	1,67	n.s.
1299	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	P63018	283	21	n.s.	n.s.	-1,53	-1,58
RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS									
1548	Catalase	Cat	P04762	363	22	n.s.	n.s.	1,66	n.s.
MISCELLANEUS									
871	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	Cps1	P07756	108	21	-4,49	-2.62	-6,24	-4,09
	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Aldh1l2	D3ZTP0	80	13				
878	Macrophage-capping protein	Capg	Q6AYC4	132	10	-2,39	n.s.	-3,21	-2,71
	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	Cps1	P07756	132	23				
	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Aldh1l1	P28037	106	13		n.s.	-6,24	

n.s.=no significant value.

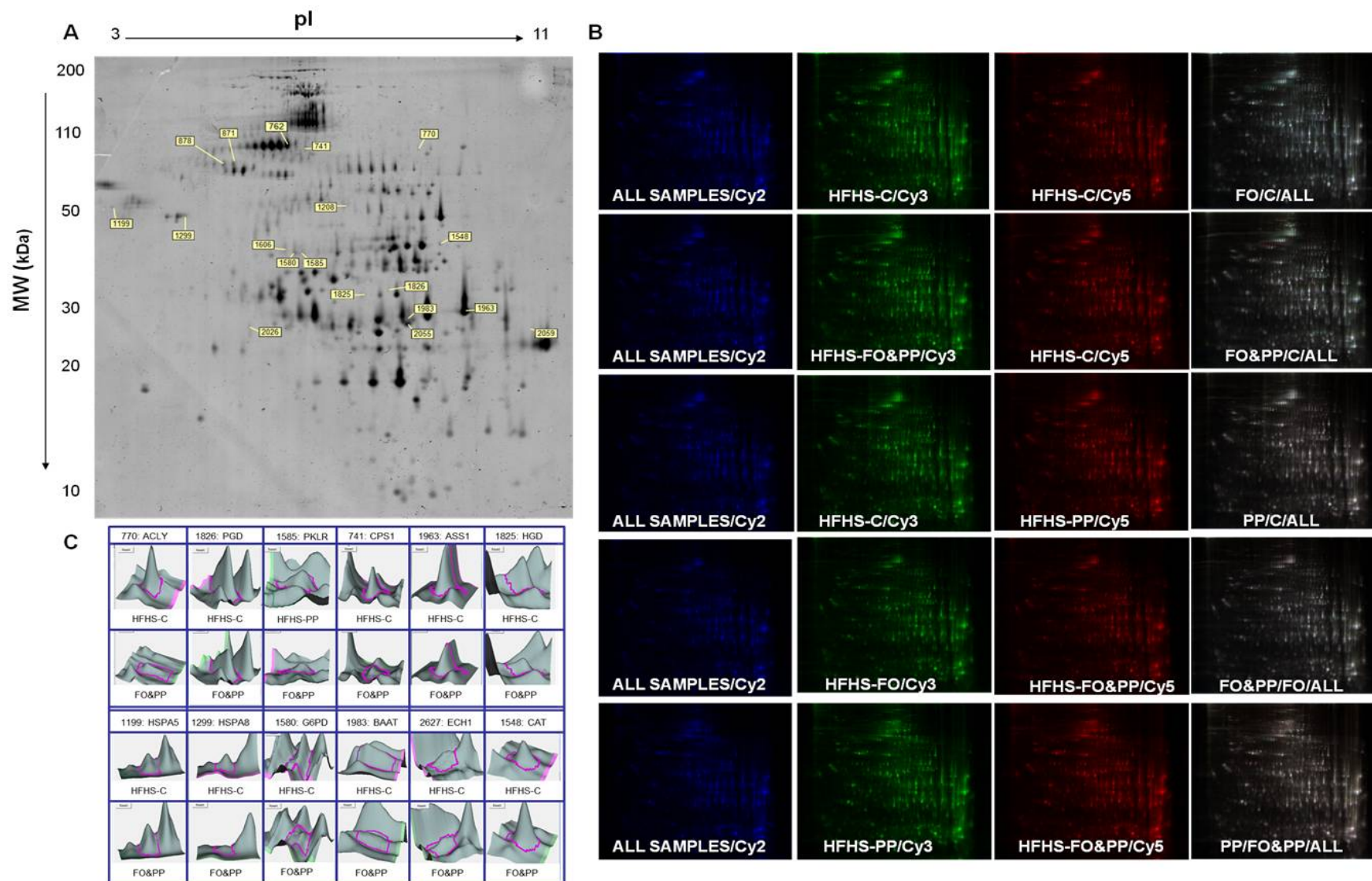


Figure 4. 2D-DIGE analysis of the regulation of liver proteins of HFHS-fed rats. A). Representative image of a 2D-DIGE gel showing spot identification numbers (SSP) (refer to those in table 6) for proteins found differentially regulated by supplements in the HFHS background. B). Representative images of 2D-DIGE gels according to experimental design showed in the table 2. C) 3D view of ACLY, PGD, PKLR, CPS1, ASS1, HGD, HSPA5, HSPA8, G6PD, BAAT, ECH1 and CAT.

4.5.4. Functional information of differentially regulated proteins in HFHS-fed rats: gene ontologies and network analysis

PANTHER analysis revealed the presence of 21 different protein classes (Figure 5A). The most relevant classes were transferases (15.2%), oxidoreductases (13.9%), ligases (11.4%), hydrolases (10.1%), lyases (7.6%) and isomerases (7.6%). The elevated number of oxidoreductases affected by FO or/and PP supported the known role of these bioactive compounds in the homeostasis redox.

With regard to their biological function, PANTHER revealed 11 biological functions (Figure 5B). Metabolic processes were the most relevant biological processes, representing for the global dataset the 49.4% of the data. Among them, the 89.5% were proteins involved in primary metabolic processes such as lipid metabolic process (38.2%), protein metabolic process (35.3%), carbohydrate metabolic process (26.5%) cellular amino acid metabolic process (23.5%), nucleobase-containing compound metabolic process (11.8%) and the tricarboxylic acid cycle (2.9%).

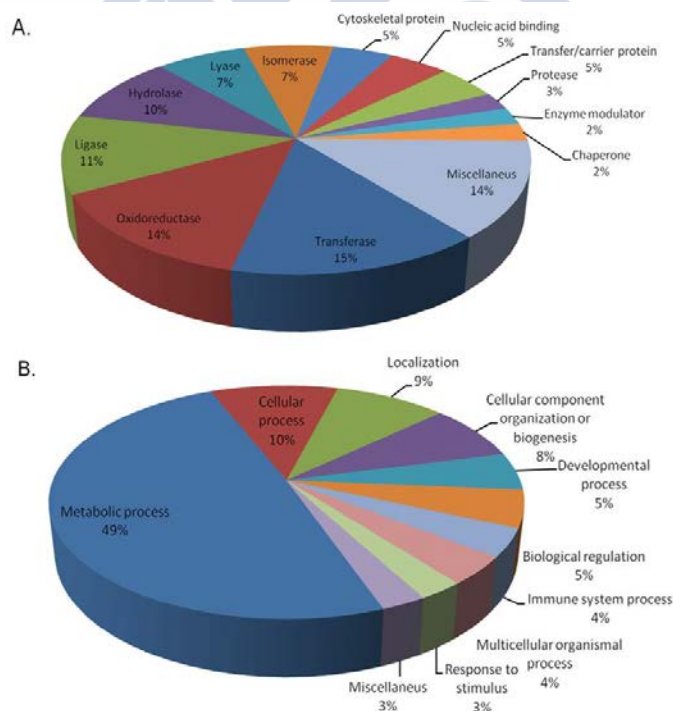


Figura 5. Protein classes (A) and biological process enrichment analysis (B) of the deregulated proteins (tables 4 and 5) by FO, PP and/or FO&PP in the HFHS background, categorized by PANTHER.

STRING database analysis showed a network composed by 74 nodes (or proteins) and enriched in interactions or edges (147 interactions, 22 direct interactions among the proteins of interest, $p = 2.18 \times 10^{-6}$) (Figure. 6). The topological analysis of the network revealed the existence of several sub-networks, in concordance with the main biological functions. Inside the sub-networks of lipid metabolism and cellular amino acid metabolism, the proteins of interest showed highly connected interactions. Moreover, both sub-networks were highly interconnected through Baat and Slc27a5 (from lipid metabolism) and Oct, Cps1 and Hgd (from cellular amino acid metabolism), and sparsely interconnected through Acly and Asl, respectively.

It is worth noting that the protein Srebf1 (a transcription factor that plays a central role in hepatic lipid and glucose metabolism, which stimulates lipogenic enzymes upon activation by glucose and insulin) is closely connected with three proteins of interest from lipid sub-network (Fasn, Acly and Fdps) and one from carbohydrate metabolism sub-network (Pklr), stating a closely relation between the two sub-networks.

Meanwhile, the cellular amino acid metabolism sub-network was connected with Yars, a protein of interest belonging to protein metabolism.

The last important sub-network was the protein metabolism one. In this sub-network, the Psmb8 and the rest of proteasome subunits constituted a central interplay with highly interconnections and several mildly and sparsely direct interactions with other proteins of the same sub-network, such as Ppp2r1a, Eif4g1, Hspa5, Hspa8, Ube2n and with proteins from some of the others sub-networks, i.e. Acly (lipid metabolism) Copb1 and Cope, (localization/transport) and Sod1 (response to oxidative stress). Overlooking proteins corresponding to proteasome, the proteins from this sub-network presented slightly direct interactions with proteins from almost all the rest of sub-networks (except to the carbohydrate metabolism sub-network).

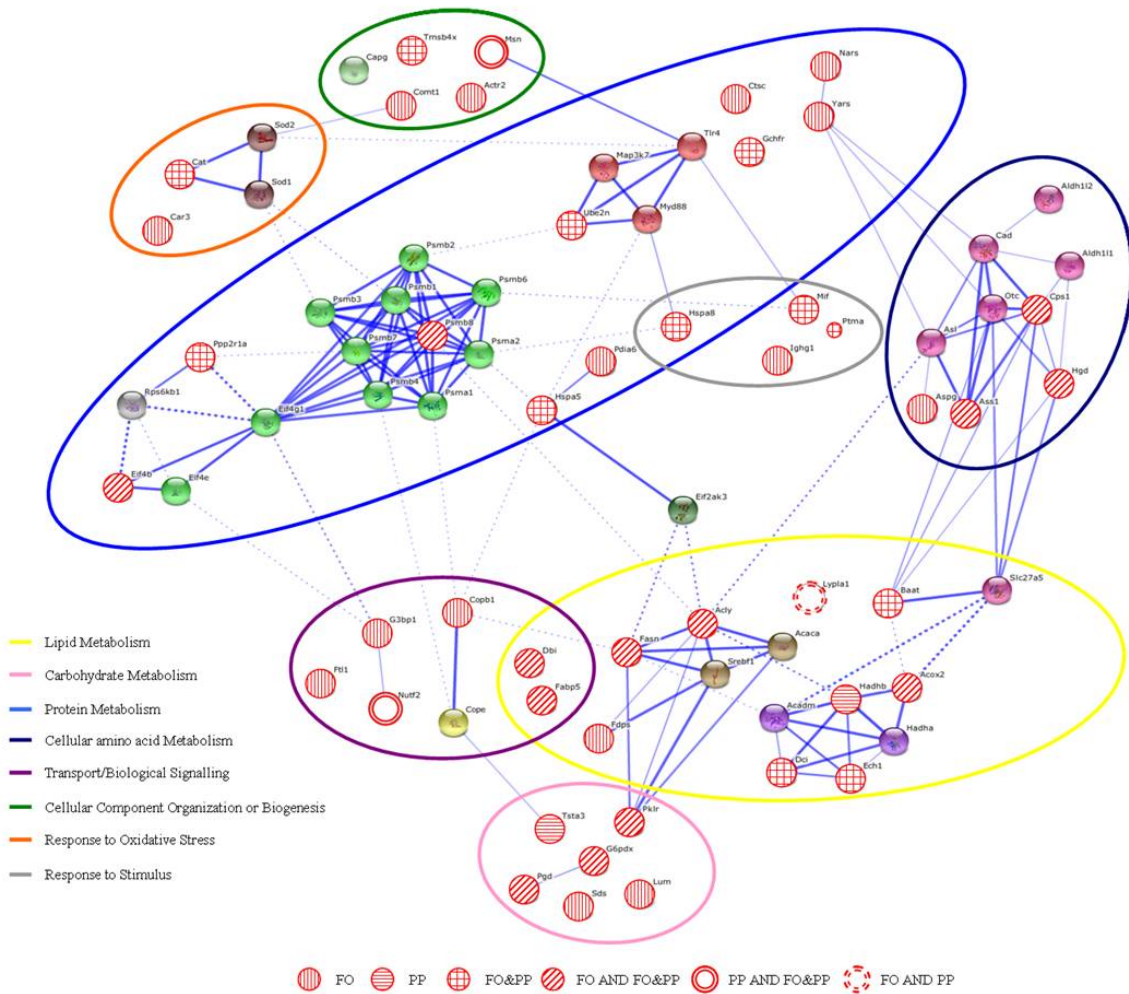


Figure 6. Biological network analysis of deregulated protein by FO, PP and/or FO&PP supplementations in the HFHS background by using the STRING software. The proteins of interest were the 45 deregulated proteins from Tables 4 and 5. Lines indicate the known interrelationships and stronger associations are represented by thicker lines.

4.6. Discussion

This study considered the modulation of proteins due to the supplementation with fish oils in two different dietary backgrounds: low- or high- fat and sucrose diets, and the effect of their combination with an antioxidant agent (grape polyphenols) who provided reducing power. Our results showed that the supplementation with FO as well as PP and FO&PP of HFHS diets exerted a weightier effect than the supplementation of LFLS diets. It is possible that the consumption of unhealthy HFHS diets triggered in higher metabolic alterations and therefore, the response of these rats to the different supplementations could be higher.

Additionally, in both dietary contexts the supplementation with FO or PP or FO&PP revealed a different efficiency of supplements to induced changes on liver protein regulation as compared to their respectively control diets, being the two diets with high amount of FO the main responsible of the changes in protein quantity. In fact, considering the total number of deregulated proteins, PP supplementation only altered two proteins versus the six proteins altered by FO and the six altered by FO&PP, in the context of LFLS diets. When comparing HFHS diets, the two HFHS supplemented with FO also provoked much higher effect on protein regulation than PP supplementation. In this case, of the forty-six different protein deregulated found in HFHS-diet background by the two complementary quantity methods, iTRAQ and DIGE, the FO supplementation altered thirty-one proteins versus only the seven proteins altered by PP. The combined action of fish oil and polyphenols, FO&PP, resulted in twenty-eight deregulated proteins, a lower number than that found by only FO. So that in absolute terms, it seems clear that the higher effect on protein regulation also in the context of HFHS diet can be attributed to FO supplementation.

It should be noted that in both LFLS and HFHS backgrounds, the combined action of fish oil and polyphenols was not the result of the simple addition of fish oil and polyphenols, supporting a possible interactive effect of these bioactive compounds. In fact, some proteins that were altered only by fish oil or only by polyphenols, did not showed dysregulation by their combination and vice versa, some proteins appeared only altered by the combination FO&PP.

4.6.1. Liver protein regulation in LFLS diets

The analysis of iTRAQ data from the rats fed LFLS diets revealed that as regards to lipid metabolism, only one protein, ACSL1, was found altered in the context of LFLS diets, resulting down-regulated by the combination FO&PP. This enzyme ACSL1 plays an important role in fatty acid metabolism and triacylglycerol (TAG) synthesis. In liver ACSL1 is a PPAR- α target gene and dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids, which are described as PPAR- α agonists, has demonstrated that increase the mRNA of ACSL1 [359]. The down-regulation of ACSL1 protein found in our study under FO&PP supplementation are not necessary in disagreement with the agonist effect of FO and PPAR- α , because the available data reflects a high complexity in the regulation of this protein. In fact, it has been reported that mRNA and

protein amount ACSL1 are dissociated in liver and it has been suggested that this discrepancy could respond to differences in the regulation of mRNA processing and translation or from posttranslational modifications that affect protein turnover [360].

The glycolysis pathway also appeared to be altered in LFLS diets. The three supplementations tested significantly down-regulated the enzyme ALDOA as compared to the control group, which could mean a strong regulation of ALDOA by food components. The aldolase A ALDOA is not the main aldolase in liver, which has higher level of aldolase B [361]. On the basis of the kinetic properties of these isoenzymes, it has been suggested that aldolase B have a role in gluconeogenesis while aldolase A is more effective participating in glycolysis [362]. So if ALDOA is an important glycolytic enzyme, the down-regulation of ALDOA could reduce the glycolysis of carbohydrates in diet and hence, decrease the production of acetyl-CoA for triglyceride synthesis in the liver. Accordingly FO&PP showed a significant reduction of FFA in plasma, and also similar trends were found in FO and PP diets. Moreover, neither group showed steatosis nor increased their hepatosomatic liver. However, the three supplemented rats increased their adiposity indexes. It is possible that in the context of LFLS diet, the supplements provoke higher clearance of lipids by the adipose tissue. It could be interesting to study the effects of FO, PP and both on adipose tissue proteins in the context of LFLS in order to clarify these findings.

Additionally, FO altered ZADH2, a protein poorly known and involved in human carbohydrate metabolism. However, recent studies have demonstrated that the protein ZADH2 is a member of prostaglandin reductase family which regulates the PPAR- γ activity and modulates adipogenesis in the adipose tissue [363]. More investigation is required for revealing the role of ZADH2 in the liver.

Through different ways, FO and PP seemed to modulate cellular amino acid metabolism. FO and FO&PP significantly reduced the protein CSAD, involved in the cysteine catabolism and in the taurine and hypotaurine biosynthesis [364] and PP diet down-regulated GLS2, a key protein in the alanine, aspartate and glutamate metabolism. It has been found that the levels of hepatic glutaminase are regulated by feeding conditions and diet composition and increased during starvation and diabetes. Also, it is involved in liver glyconeogenesis and urea synthesis [365].

The combination of FO and PP also displayed in these diets a role in protein metabolism and cellular component organization by down-regulating the chaperone TBCA and COPB1.

It should be not that only the supplementation with FO alone could modulate Ras signaling, because down-regulate the chaperone CCT2 closely related to proteins involved in Ras signaling [366] and significantly up-regulated the protein G3BP1 that directly associate with the SH3 domain of GTPase-activating protein (GAP), with functions as an inhibitor of Ras [367], suggesting an important role of FO in Ras signaling pathway which could be modulated by the PP addition. Other authors demonstrated that omega-6 fatty acids such as linoleic acid, which are presented in high concentration in the soybean oil used in our study [347], and the omega-3 fatty acids, specially DHA, differentially modulate Ras signaling [368] Polyphenols also have showed an important role on Ras signaling [369]. However, our data showed a scarcely individual effect of PP on this pathway by an important role as modulators of FO action.

The slightly effect on liver protein regulation into the context of LFLS diets was in concordance to the scarcely effect on biochemical measurements. In comparison with control diet, only the FO&PP significantly reduced the FFA plasma levels, fact that could be correlated to the effect found in liver lipid and carbohydrate metabolism pathways.

4.6.2. Liver protein regulation in HFHS diets

Our results obtained from the iTRAQ and DIGE methods showed that the two supplementations with FO significantly altered the levels of proteins from lipid and carbohydrate metabolism when they were compared with the HFHS control supplemented with soybean oil. Thereby, FO and FO&PP simultaneously down-regulated proteins involved in lipid synthesis, trafficking and store, glycolysis and up-regulated proteins involved in fatty acid oxidation. Interestingly, it has been reported that the consumption of high-saturated fat and -sucrose diet increased proteins involved in lipogenesis and glycolysis pathways and decreased proteins from lipid β -oxidation [370], just the opposite effect found of FO and FO&PP in our research. Accordingly, the rats fed FO and FO&PP significantly improved their plasma lipid profile by reducing their total cholesterol and their FFA.

It has been described that marine long chain omega-3 exert their hypolipidemic effect by modulating gene transcription through a marked reduction of the transcription factor sterol

regulatory element-binding proteins (SREBPs) 1 and 2 which play a central role in hepatic lipid and glucose metabolism, stimulating lipogenic enzymes upon activation by glucose and insulin [110]. In contrast, Westernized diets and pathological conditions such as hyperinsulinemia induce the systematic stimulation of the gene of SREBPs [371]. We found several important lipogenic protein targets of SREBPs clearly down-regulated in the two diets rich in FO: ACLY, which synthesizes cytosolic acetyl-CoA necessary for both cholesterol and TG synthesis, FASN, which synthesizes long-chain saturated fatty acids and the cytosolic FPP synthase (FDPS), an enzyme involve in cholesterol synthesis. These results are in agreement with previous studies which reported repression of ACLY and FASN gene after fish oil supplementation or their enzyme activities [372] or their protein amounts [329]. In contrast, ACLY, FASN and FDPS gene expression were found up-regulated by high saturated fat diet intake [371].

SREBP-1c specifically increases expression of enzymes that generate NADPH via the pentose phosphate pathway needed for both cholesterol and TG synthesis [102, 104, 373]. Remarkably, we found that both FO and FO&PP significantly reduced PGD and G6PDH, two of those enzymes involved in the generation of NADPH.

Two proteins which participate in lipid trafficking and storage were also down-regulated by FO or FO&PP: FABP5 and ACBP. Previous studies have demonstrated that the gene expression of FABP5 are positively related to Western-type diet feeding, obesity, fat liver accumulation and type 2 diabetes [374] and even the lacking of FABP5 could protected from diet-induced obesity and accumulation of fat in the liver [375]. For these reasons, FABP5 has been suggested as a novel hepatic SREBP target genes [374]. The second protein was ACBP, also target of SREBP and PPARs [376]. Although the specific biological function of the protein in cells is presently unknown, it has been reported that the levels of ACBP in rat liver increase after consumption of a high-fat diet and also ACBP seems to stimulate the synthesis of long-chain fatty acyl-CoA [377]. The levels of ACBP in tissues have shown a positive correlation with the concentration of triglycerides in liver of rats, suggesting a role for this protein in intermediary regulation of lipid metabolism [378]. These fatty acid and acyl-CoA binding proteins (FABPs and ACBPs) could be potential candidates to transcription factors that could transducer the fatty acid signals to DNA and therefore contribute to explain omega-3 mechanism of action in this case [103].

The enzyme ACOX2, involved in peroxisomal fatty acid β -oxidation and PPAR signaling was strongly up-regulated by both FO and FO&PP. In contrast, a reduced gene expression of ACOX2 has been previously reported by high saturated fat diets [371]. Curiously, the FO&PP group also showed higher amounts of the peroxisomal CAT than controls. So in this group, when the production of hydrogen peroxide increases as consequence of the up-regulation of ACOX2, the excess of hydrogen peroxide can be more effectively detoxified by CAT in peroxisomes.

Enzymes involved in the mitochondrial fatty acid β -oxidation were also altered by supplementing with the combination of FO&PP. Indeed, FO&PP up-regulated the levels of mitochondrial protein ECI1 and down-regulated the levels of ECH1, both proteins targets of PPARs [329]. Meanwhile ECI1 are the key enzyme for the mitochondrial β -oxidation of all types of unsaturated fatty acids [379], ECH1 is involved in alternative pathways for oxidation of specifically unsaturated fatty acid with cis-double bond at odd-numbered position [380], such as oleic acid or araquidonic acid but also ALA, EPA and DHA. Our results showed that FO&PP increases the main pathway for UFA β -oxidation in the mitochondria, but could reduce, at least in part, the oxidation of fatty acids such as EPA and DHA, which were in high relatively concentration in the FO&PP diet. Wrzesinski et al. have reported that only the combination of fish oil with an antioxidant (TTA, a synthetic fatty acid) increased the ECI1 levels when were included in a high fat diet. However, they found that protein amount of ECH1 increased with the combination of FO with TTA [329]. The different behavior of these two antioxidants could respond to a different way of modulation on the effect of FO on liver protein such as ECH1 by the antioxidant. Interestingly, their antioxidant (TTA) also increased the level of the subunit alpha of mitochondrial trifunctional enzyme, also involved in the long chain FA β -oxidation [329]. On the contrary, our results showed that the PP supplementation reduced the level of subunit beta of that trifunctional enzyme (HADHB). Baiges et al. showed that grape polyphenols up-regulated the level of several proteins of β -oxidation but down-regulated others, such as the mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase 1, when there were included in a “cafeteria” diet [146].

Therefore, FO and FO&PP showed similar trends for repressing lipid synthesis, being FO&PP more effective to provoke changes in proteins involved in the mitochondrial fatty acid β -oxidation. Taking into account these findings, it seems clear that FO and PP exert a tight control

on unsaturated fatty β -acid oxidation, and hence their combination could display a specific and higher action on this pathway.

On the other hand, it has been reported that non-esterified polyunsaturated fatty acyl-CoA levels especially of ALA, EPA and DHA can directly bind to HNF-4 α and inhibit its effects on gene transcription. Meanwhile the binding of saturated fatty acids stimulated the HNF-4 α gene transcription [102]. The inhibition of HNF-4 α by omega-3 PUFA affect carbohydrate metabolism by decreasing the transcription of genes such as the glycolytic PKLR, one of the gene stimulated by HNF-4 α [103]. Supporting this inhibitory effect of marine omega-3 PUFA on HNF-4 α , our results revealed a significant reduction of the glycolytic enzyme PKLR in both FO and FO&PP supplemented groups. The down-regulation of the glycolysis of carbohydrates of diet decrease the production of acetyl-CoA for lipid synthesis. Other authors have reported high glycolytic activity in rats fed high saturated fat diets or fed high glucose diets [146, 381]. Iron metabolism is also under HNF-4 α control, which stimulates genes such as transferrin [103]. Higher levels of ferritin and transferrin at baseline were associated with the metabolic syndrome anomalies and hyperinsulinemia induced by high fat diets, because can increase oxidative stress that worsens mitochondrial dysfunction in liver [382]. So the down-regulation of ferritin found under FO rich diet could indicate a lower inclination to develop liver diseases induced by HFHS diets. HNF-4 α also has a critical role in the maintenance of bile acid (BA) homeostasis. It has been also reported that the expression of BAAT gene depends on HNF-4 α binding sites and HNF-4 α expression [383]. Our results showed that the FO&PP combination reduced BAAT level. The alterations on PKLR, ferritin and BAAT by FO diets supporting the direct modulation of omega-3 PUFA of HNF-4 α which can be modified by polyphenols.

Other group of proteins significantly altered by FO and FO&PP belonged to protein and amino acid metabolism. It has been described that PPAR- α and hence SREBPs regulate amino acid metabolism by suppressing genes involved in transamination and deamination as well as genes involved in urea cycle [329]. Accordingly, FO and FO&PP diets significantly down-regulated two key enzymes in the urea cycle (CPS1 and ASS1). Additionally, FO&PP down-regulated HGD, involved in the catabolism of tyrosine and phenylalanine, and FO down-regulated ASPG and SDS also involved in amino acid catabolism, findings that could support the agonistic effect of fish oil and PPAR- α [384].

Both diets containing FO also significantly reduced PSM8, but the most effective one was the combination of FO&PP. Proteasome has a key role in insulin signaling, because it has been described that an enhanced proteasomal degradation of insulin signaling proteins cause insulin resistance in mouse fed high saturated diet [371]. Therefore, the down-regulation of proteasome by FO and FO&PP could improve the insulin sensitivity of these rats. Accordingly, the insulin plasma levels and the HbAc% in these groups tended to be reduced and these rats also showed a significantly reduction of FFA in plasma. Moreover, since insulin regulated cytoskeleton activities [385], the changes found in our study in proteins related to cellular organization and especially to actin cytoskeleton (moesin, thymosin 4 beta and probably NUTF2 which were found altered by FO&PP, and ACTR2 and COPB1, altered by FO) support the influence of FO on insulin signaling.

Moreover, both FO and FO&PP diets clearly up-regulated the EIF4B. This up-regulation could indicate lower oxidative stress in the rats fed FO diets. Under stress conditions such as oxidative stress, cytoplasmic stress granules are formed to inhibit translation initiation and it is precisely the reduction of the levels of the eukaryotic initiation factors such as EIF4B which trigger the formation of these stress granules [386]. Interestingly, FO&PP also increased CAT and PTMA levels. Among the different roles of the hormone PTMA, it has been noted that attenuates lipid peroxidation in rats [387], and the enzyme CA3, a participant in the liver response to oxidative stress [388], was significantly up-regulated by FO. Similar trends, although not significant, were found with the combination FO&PP. Considering that FO and FO&PP rats showed lower protein oxidation in liver compared with controls and the significant higher levels of EIF4B, CAT, PTMA and CA3 found in diets containing FO, it could be assumed an effect for decreasing the oxidative stress and improving antioxidant system.

Take into account an overview of the total proteins deregulated, FO and FO&PP supplementations showed higher differences on the pathways associated to protein and amino acid metabolism. The down-regulation of the protein PPP2R1A which occurs only in FO&PP could alter many biological pathways. For example, PPP2R1A could be involved in the activation of the carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP), which was proposed as transcription factor modulated by fatty acid [103]. ChREBP stimulates the transcription of the gene of the liver isozyme of PKLR [389]. The down-regulation of PPP2R1A by FO&PP could

reduce ChREBP activation and therefore PKLR levels, as reflected in our results described before. Also, lower PPP2R1A levels could improve insulin signaling because PPP2R1A negatively regulates insulin' metabolic pathway by inhibiting Akt activity [390]. Other authors found that PPP2R1A amounts were increased by a diet high in saturated fat.

Another evidence of a possible synergism between FO and PP can be observed from the finding that only FO&PP increased the protein levels of the chaperone HSPA5. This finding is very important because HSPA5 has a critical role in the unfolded protein response (UPR) [391]. The accumulation of unfolded or misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) caused by pathophysiological conditions such as elevated levels of fatty acids or cholesterol, oxidative stress, high or low glucose levels, inflammatory cytokines or hypoxia induce ER stress and activates the UPR chronically [392]. Protein levels of HSPA5 are the key factors that regulate the UPR signaling. High levels of functional HSPA5 proteins in the liver mitigate the UPR, alleviate ER stress and improve chronic inflammation [393, 394]. Also, HSPA5 overexpression inhibited activation of the SREBP-1c reducing the expression of lipogenic genes and improving glucose homeostatic control in obese mice [395] and also it has been reported that HSPA5 protein levels are significantly reduced in a model of fatty liver [396]. In the present study, higher level of HSPA5 protein could be an index of lower ER stress in the liver of FO&PP rats. The lower carbonylation protein level found in this group could lead to lower accumulation of misfolding proteins, supporting these results. Moreover, the activation of UPR pathways leads to inflammation by activation of nuclear factor-kB (NF-KB) [397]. FO&PP had also reduced levels of the UBE2N, which participate in the induction and expression of NF-KB and MAPK-responsive inflammatory genes [399], and reduced the levels of the protein LOC679748 as well, likely a pro-inflammatory cytokine belonging to MIF superfamily [400]. The down-regulation of the chaperone HSPA8 in FO&PP group, whose gene is stimulated after the activation of UPR signaling, also supports the alleviation of endoplasmic reticulum stress by the synergy of FO&PP. HSPA8 also forms part of the spliceosome, which was found increased under high saturated diet [401].

Meanwhile, only FO supplementation down-regulated two aminoacyl-tRNA synthetases: the proteins Nars and Yars. Besides their role in protein synthesis, recent research has indicated alternative functions for these enzymes. In fact, Nars is an inflammatory cytokine and Yars is an

angiogenic cytokine [402]. Other important difference between FO and FO&PP is that only the former diet altered proteins directly related to Ras signaling. Firstly, only FO clearly up-regulated the G3BP1. Among its multiple biological functions, this protein directly associates with the protein GAP or RASA1, which functions as an inhibitor of Ras [403]. This markedly up-regulation of G3BP1 by FO was also found in the context of LFLS diets, reinforcing the influence of FO on this specific protein and the modulator effect exerted by PP supplementation in both backgrounds. Secondly, FO down-regulated the protein APT1, an enzyme involved in the regulation of Ras function by depalmitoylation of several isoforms of Ras [404]. Although APT1 was found down-regulated by FO and PP supplementations, surprisingly the combination of both did not alter APT1 levels. As in the case of LFLS diets, FO seemed to play a critical role in the Ras signaling in the HFHS background, and again the role of PP seemed to act as modulators of the FO action. This fact reinforces the idea of that the synergetic action of FO and PP is more than the simple sum of their individual actions.

The COMT, involved in catecholamine's degradation, and LUM, involved in biological adhesion, were two proteins down-regulated by FO. Similar trends but not significantly were found in FO&PP treatment. Although COMT is involved in catecholamine's degradation and did not have a direct link with lipid metabolism, it has been reported that increased in rats with hepatocellular steatosis, indicating that probably COMT can activate toxicological pathways still unknown [396]. It should be noted that FO&PP significantly reduced GFRP protein levels, which inhibits the production of tetrahydrobiopterin, the cofactor necessary for catecholamine's biosynthesis [405]. LUM has been found in the liver of human obese patients and although the control of LUM (a 40 kDa keratin sulfate proteoglycan) gene expression is poorly understood, seems to be stimulated by oxidative stress and NF-KB [406]. Accordingly with these results on the down regulation of LUM, FO treatments reduced liver protein oxidation and probably the activation of NF-KB as previously discussed.

To sum up, biochemical and proteomics data revealed that HFHS control diet and HFHS-PP diet display quite similar effects. However, a role of FO on the modulation of liver proteins and improvement of lipid profile and insulin levels seems to be occurred, and this effect was maintained and reinforced when FO were supplemented with PP.

4.7. Conclusions

The present results reveal a role of the consumption of FO, especially visible under a background of high fat high sucrose diets, for regulating liver proteins resulting in an improvement on metabolic pathways. Proteomics analysis revealed that omega-3 PUFA from fish oils were the main force in the modulation of Ras signaling and down-regulation the hepatic lipogenesis and glycolysis, maybe by directly regulating nuclear factors such as HNF-4 α or PPAR- α . Moreover, the effect of FO was stimulated in presence of PP. Then, the addition of polyphenols to fish oils increased their capacity for regulation the fatty acid beta-oxidation, ameliorated ER stress, the liver protein oxidation levels and improved insulin signaling. Results display a potential synergistic effect when fish oils are consumed together to polyphenols, targeting the regulation of proteins related to protein and amino acid metabolism. In conclusion, the fat quality in terms of fatty acid composition plays a critical role on liver protein regulation, being its action highly dependent on the dietary background.





V. DISCUSIÓN INTEGRADORA

La comprensión de la compleja interacción existente entre nutrición y metabolismo celular es uno de los principales retos de la investigación nutricional moderna, con el objetivo último de mejorar la salud y prevenir la enfermedad. Partiendo de este escenario, la investigación llevada a cabo en esta tesis doctoral pretendió explorar los mecanismos por los que determinados componentes de la dieta influyen sobre aspectos de la bioquímica celular para entender su implicación tanto en la prevención como en el desarrollo de alteraciones metabólicas que pueden ser relacionadas con la dieta. Y lo hizo principalmente desde la perspectiva de las proteínas, valiéndose de herramientas de proteómica redox y proteómica cuantitativa.

El estudio de esta compleja interacción entre dieta y metabolismo puede ser abordado desde diferentes ópticas, pero, sin lugar a dudas, la determinación del estrés oxidativo asociado a la dieta es un aspecto clave [29, 407], ya que dicho estrés oxidativo es determinante en la etiología y progresión de numerosas enfermedades humanas así como en procesos naturales como el envejecimiento [195].

Por ello, una parte importante de esta tesis doctoral enfocó el estudio del estrés oxidativo y la dieta, empleando la carbonilación de las proteínas como biomarcador principal. Esta elección de los grupos carbonilos de las proteínas como marcadores de estrés oxidativo, se fundamentó en las diversas ventajas que presentan dichos biomarcadores, tales como que su formación se considera el tipo más general de oxidación proteica, que se correlacionan bien con el daño oxidativo y que son de formación temprana y relativamente estables [189]. De hecho, las células pueden tardar horas o incluso días en degradar las proteínas carboniladas [207]. La estabilidad química de los carbonilos proteicos no sólo los convierte en parámetros adecuados para su determinación en el laboratorio, sino que también va a permitir su almacenamiento, ya que permanecen estables al menos durante 3 meses conservados a -80°C [408].

Desde un punto de vista bioquímico y considerando la importancia de las proteínas en el metabolismo celular, estudiar cómo determinados componentes de la dieta, tales como los ácidos grasos de origen marino o determinadas situaciones patológicas modulan la carbonilación proteica permitirá obtener información muy valiosa tanto de las proteínas diana como de las rutas bioquímicas afectadas y explicar e incluso predecir la aparición de alteraciones metabólicas o justificar según el caso, la acción beneficiosa o perjudicial sobre la

salud de los componentes evaluados. La posibilidad de identificar biomarcadores de alteración metabólica es otra de las ventajas de este tipo de investigaciones.

Otro pilar importante de esta tesis se asentó sobre la metodología proteómica empleada para la correcta evaluación de los niveles de carbonilación proteica. En este aspecto, en los diferentes capítulos englobados dentro de la proteómica redox, se empleó un método proteómico basado en un protocolo descrito por Chaudhuri y colaboradores, inicialmente desarrollado para determinar el nivel de carbonilación de las proteínas citosólicas del hígado en ratones envejecidos [409]. Tomando como referencia dicho protocolo, se estudió la carbonilación proteica resultante tras diferentes intervenciones nutricionales y bajo distintas alteraciones metabólicas, empleando para ello modelos animales y focalizando el estudio en tejidos y fluidos biológicos como el plasma, el hígado, el riñón y el músculo esquelético.

El método elegido permitió la evaluación de la carbonilación proteica general y específica dentro de una investigación nutricional, y ofreció importantes ventajas frente a otros métodos basados en gel, principalmente frente al método clásico más popular empleado para determinar la carbonilación proteica, que consiste en la derivatización de los grupos carbonilo con DNPH seguida del análisis por Western blot [229]. Así, el protocolo empleado en esta tesis basado en el empleo de un derivatizante fluorescente, la FTSC, ofrece una sensibilidad equiparable al método del DNPH, pero muestra varias ventajas entre las que pueden citarse que la detección por fluorescencia de los grupos carbonilos evita la realización de Western blot, la necesidad de desarrollar geles paralelos para la identificación de las proteínas, limita las pérdidas de proteína asociadas a la transferencia a membrana (minimizando errores en la cuantificación) y supone un ahorro importante tanto de tiempo como de dinero [201, 224].

Una vez desarrollada la metodología necesaria para el análisis de cada tejido, se procedió a la ejecución de los objetivos planteados en esta tesis.

El primer capítulo de esta tesis doctoral se estudió el efecto ejercido por un suplemento de ω -3 PUFAs de origen marino en el que las proporciones entre EPA y DHA fueron variables (1:1, 2:1 y 1:2), frente al efecto del consumo de un aceite con un elevado contenido en ω -6 LA. También se abordó el efecto del consumo de un aceite con un elevado contenido en ω -3 ALA. Este estudio se llevó a cabo empleando ratas hembra procedentes de la cepa consanguínea de Wistar Kyoto (WKY), una cepa ampliamente utilizada en números estudios nutricionales [156, 157]. La evaluación del comportamiento de los diferentes PUFAs en un

contexto esencialmente saludable (los suplementos fueron incorporados dentro del contexto de una dieta estándar comercial) permitió evaluar de manera específica los cambios inducidos sobre el proteoma redox por la diferente composición de ácidos grasos de la dieta, sin la influencia de factores adicionales que pudieran alterar los resultados. El modelo empleado y la intervención programada permitieron, además, determinar el efecto del consumo de los PUFAs marinos sobre la prevención de alteraciones metabólicas ligadas a la dieta, cuya etiología está ligada al estrés oxidativo [39, 410].

De manera general, el análisis de los resultados obtenidos reflejó que las mezclas de EPA y DHA evaluadas redujeron de manera significativa el nivel de carbonilación de las proteínas en los distintos tejidos analizados así como los niveles de ácidos grasos totales en el plasma, alteraron los perfiles de los ácidos grasos libres en el plasma y en la membrana de los eritrocitos, incrementando significativamente el contenido en EPA y DHA y reduciendo el contenido en ARA. Asimismo, mostraron una clara tendencia a mejorar otros parámetros bioquímicos evaluados, tales como el contenido en triglicéridos en plasma, la concentración de colesterol total o el contenido en proteína C reactiva, sobre todo con respecto al grupo suplementado con el aceite rico en ω -6 LA.

Cabe destacar que estudios previos recogidos en la bibliografía han vinculado el consumo de ω -3 ALA con un descenso en los marcadores de estrés oxidativo [411] y una atenuación de los factores de riesgo del síndrome metabólico en comparación con el ω -6 LA [412]. Sin embargo, los resultados obtenidos en este primer capítulo indicaron que, al menos *in vivo*, este ácido graso no fue tan efectivo como sus derivados de cadena larga, EPA y DHA, en la prevención del daño proteico oxidativo, mostrando niveles similares de carbonilación proteica en los tejidos analizados que el grupo suplementado con ω -6 LA. Probablemente, este resultado se deba a que el ALA no es capaz de competir de manera eficiente con el ARA de las membranas, el ácido graso responsable en gran medida del efecto pro-oxidante mostrado por la suplementación con LA [124], principalmente como consecuencia de la baja tasa de conversión de ALA a EPA y DHA unida al hecho de ser el ácido graso insaturado que más rápidamente se oxida a acetil-CoA [88]. Como posible confirmación a este fenómeno, el ALA no se incorporó de manera significativa a la membrana de los eritrocitos en ninguno de los grupos evaluados ni siquiera en el grupo suplementado con el propio ALA, y este grupo presentó niveles similares de ARA en las membranas de sus eritrocitos que el grupo suplementado con ω -6 LA. Por tanto, la investigación realizada refuerza la idea de que, para

conseguir los efectos beneficiosos atribuidos a EPA y DHA, es necesario incluir estos ácidos directamente en la dieta.

Del análisis de los niveles generales de carbonilación proteica, se pudo deducir que la efectividad de EPA y DHA para reducir los niveles de oxidación proteica depende en gran medida de sus proporciones relativas. En este sentido, la mezcla equitativa de EPA y DHA (1:1) demostró ser la más efectiva disminuyendo los niveles de carbonilación en el plasma y en los tejidos estudiados (hígado, músculo esquelético y riñón). Este resultado está de acuerdo con la diferente habilidad para modular el estrés oxidativo del EPA y el DHA recogido en la literatura [124, 413]. Las proporciones 2:1 y 1:2, si bien también mostraron menor carbonilación proteica, su efecto protector fue más débil y más dependiente del tejido analizado, mostrando, por tanto, una mayor variabilidad. Este resultado sobre la dependencia de la carbonilación proteica y las proporciones de los PUFAs omega-3 se observó también a nivel bioquímico e histopatológico. La proporción 1:1 demostró ser la más efectiva mejorando los niveles de otros marcadores de estrés oxidativo, de riesgo cardiovascular así como parámetros histopatológicos evaluados en los mismos animales [348, 349].

Un hallazgo notable fue la constatación de que los diferentes tejidos analizados no responden igual a la suplementación con los distintos ácidos grasos. En este aspecto, el hígado se constituyó como el principal órgano sensible a la modulación diferencial de su proteoma redox a través de la composición de grasa de la dieta, probablemente como consecuencia de ser el órgano clave en el metabolismo de las grasas en el cuerpo.

Asimismo, el análisis del nivel individual de carbonilación de las proteínas puso de manifiesto que los diferentes ácidos grasos de la dieta ejercen una fina regulación del estado oxidativo de las proteínas de los diferentes tejidos, existiendo una diferente susceptibilidad de las mismas a oxidarse y a responder a los cambios en la composición de PUFAs de la dieta. Consecuentemente, el análisis pormenorizado del daño oxidativo reveló que del total de proteínas carboniladas identificadas, no todas redujeron su estado oxidativo, existiendo una serie de proteínas diana del efecto protector del EPA y el DHA. En particular, la albúmina en el plasma y en el hígado, la actina en el músculo, una proteína no identificada en el riñón y otras tres proteínas hepáticas (ASS, AKR y AST). Esta diferente susceptibilidad de las proteínas a oxidarse unida al hecho de que se detectaron proteínas muy concentradas que no se carbonilaban o lo hacían de manera despreciable y proteínas muy poco concentradas pero extremadamente carboniladas, apoyan la falta de aleatoriedad de la carbonilación proteica (es

mucho más que un mero reflejo de los niveles de ROS) y probablemente, refuerzan su rol en mecanismos de señalización celular. Estas características oxidativas diferenciales se obtuvieron también como resultado de los dos experimentos posteriores recogidos en los capítulos 2 y 3 de esta tesis. Otro hecho que refuerza la especificidad del fenómeno de carbonilación reside en que se encontró que aunque la mayoría de las proteínas del hígado redujeron su daño, una proteína, la AST, incrementó su nivel de carbonilación tras la suplementación con EPA y DHA, demostrando la capacidad selectiva de respuesta a la carbonilación de las proteínas presentes en el mismo tejido.

La identificación de las proteínas diana de carbonilación del efecto de los omega-3 de pescado permitió identificar rutas potencialmente moduladas por estos ácidos. La reducción del daño oxidativo de la albúmina tanto en plasma como en hígado en presencia de estos ácidos grasos indicó que es una diana importante de carbonilación, probablemente porque está implicada en su transporte e interacciona de manera directa con ellos. Curiosamente, la oxidación de la albúmina en plasma disminuyó en los grupos suplementados con los aceites de pescado, en especial con la mezcla 1:1, a pesar de que dichos grupos presentaron niveles superiores de ácidos grasos con mayor número de insaturaciones en el plasma que los grupos suplementados con ALA y sobre todo con LA. Pero además, dado que la albúmina es un potente antioxidante del plasma [23], la reducción de su daño oxidativo podría indicar una mejora del estatus antioxidante de estos individuos y un posible efecto protector de cara al desarrollo de patologías a largo plazo. Los PUFAs marinos podrían tener otro efecto indirecto sobre la modulación del estado redox celular, ya que reducen la oxidación de enzima AKR, proteína implicada en la regeneración del ácido ascórbico celular [414] así como en la regulación del metabolismo de las prostaglandinas [415]. Los PUFAs marinos también parecen tener un rol alterando el metabolismo del nitrógeno. La reducida carbonilación de ASS unida al incremento en la carbonilación de AST2 podría, en conjunto, facilitar la detoxificación del amonio celular.

Por tanto, los ω -3 PUFAs de origen marino muestran dianas específicas de acción en base a la carbonilación proteica, que parecen contrarrestar los efectos negativos asociados al consumo de elevadas cantidades de ácidos grasos de la serie ω -6, característico de la dieta de las sociedades industrializadas modernas. Y parece que el grado de acción sobre las dianas es significativamente dependiente de las proporciones de EPA y DHA presentes en el aceite de pescado o suplemento. Esto apoya la teoría de la existencia de mecanismos muy finos de

regulación ejercidos por estos compuestos bioactivos y su gran dependencia de dosis, proporción y resto de composición de la dieta, que explican en parte la dispersión de los resultados recogidos en la bibliografía, sobre todo respecto a su comportamiento en la modulación del estrés oxidativo del cuerpo, e implica la necesidad de su estudio desde diferentes perspectivas a la hora de formular suplementos y alimentos funcionales enriquecidos en dichos ácidos para lograr un óptimo efecto sobre la salud.

Los resultados obtenidos en este primer estudio sobre el efecto diferencial de los PUFA de las series ω -6 y ω -3 sobre la modulación de la delicada homeostasis redox de las proteínas del cuerpo y su vinculación al desarrollo de alteraciones metabólicas, apoyan la necesidad de estudiar el perfil de carbonilación proteica asociado a dichas alteraciones metabólicas, una vez que se han manifestado en el organismo.

Los dos siguientes capítulos de esta tesis se dirigieron a estudiar el daño proteico asociado a alteraciones metabólicas relacionadas con la dieta, tales como las que caracterizan el conocido como síndrome metabólico.

En un primer lugar, se caracterizó la carbonilación proteica asociada a un modelo genético de síndrome metabólico, concretamente ratas de la cepa SHROB. Como control sano, se emplearon ratas WKY. Las ratas SHROB se consideran un modelo animal que mimetiza casi a la perfección al síndrome metabólico humano [172]. Por tanto en esta primera aproximación, se pretendió asociar por primera vez las alteraciones descritas en dicha cepa, tales como obesidad, dislipidemia, hiperinsulinemia, hipertensión o nefropatía con una alteración en el estado de carbonilación de determinadas proteínas presentes en el plasma, el hígado y el músculo esquelético.

Los datos generales de carbonilación proteica revelaron un incremento de la carbonilación en el músculo esquelético de las ratas SHROB, especialmente de la proteína ALDOA, pero una reducción del nivel total de carbonilación de las proteínas en el plasma y el hígado, en comparación con los controles sanos WKY. Estos resultados obtenidos en plasma e hígado pueden calificarse de sorprendentes si se tiene en cuenta que estudios previos han encontrado niveles elevados de estrés oxidativo sistémico en esta cepa y que un incremento de la carbonilación proteica se ha asociado con el síndrome metabólico, específicamente con la obesidad y la resistencia a insulina que muestran estas ratas [32].

La explicación a esta aparente contracción requiere de una mayor investigación, aunque existen algunos hechos que podrían explicar los resultados. En primer lugar, hay que tener en

cuenta que la reducción del nivel de carbonilación global detectado en el plasma de la cepa SHROB se atribuyó mayormente a la disminución del nivel de carbonilación de la albúmina. Este menor grado de oxidación de la albúmina en el plasma puede ser consecuencia de la hipoalbuminemia característica de las ratas SHROB [173, 416], que consiste en una reducción de la albúmina en sangre por un exceso de su excreción en orina, como consecuencia de la nefropatía que desarrolla la cepa [349]. El exceso de excreción de la albúmina podría reducir el tiempo que esta proteína permanece en la sangre y por tanto su exposición al ataque de radicales libres, conduciendo a un reducido índice de carbonilación. Además, los resultados obtenidos no mostraron un incremento de la síntesis de albúmina en el hígado que pudiera compensar esta pérdida, e incluso parecieron mostrar una tendencia a reducir dicha síntesis y por tanto, incrementar el daño.

En relación al hígado, debe considerarse que las ratas SHROB sufren la enfermedad del hígado graso no alcohólico o NAFLD, mostrando un grado de severidad bastante elevado, presentando esteatosis hepática e inflamación severa [349]. Aunque la carbonilación proteica aumenta con la esteatosis hepática y el estrés oxidativo se considera determinante en la aparición de esteatohepatitis [190], Videla y colaboradores [417] encontraron que los estados avanzados de esteatohepatitis pueden ir acompañados de una reducción en la carbonilación proteica, justificada por un incremento en la proteólisis de las proteínas oxidadas en etapas avanzadas de la enfermedad. También podría existir un mecanismo de “decarbonilación”, todavía poco conocido, por el que se produce la oxidación de los grupos carbonilos de aldehídos o cetonas a ácido carboxílico, lo que impediría su identificación con FTSC [217]. Asimismo, debe tenerse en cuenta que se trata de una cepa que desarrolla sus trastornos de manera genética, por lo que podrían existir diferencias en la regulación de la carbonilación con respecto al síndrome humano. Un estudio posterior llevado a cabo de manera paralela dentro del proyecto de investigación en el que se engloba esta tesis doctoral, confirmó que los niveles de estrés oxidativo en los distintos órganos de las ratas SHROB son variables y que probablemente responden a diferentes etapas en el desarrollo de las patologías asociadas a la cepa SHROB [416], lo cual está en concordancia con nivel diferencial de carbonilación proteica encontrado en el músculo esquelético frente al plasma y al hígado.

El análisis individualizado de los niveles de carbonilación proteica mostró que las ratas SHROB presentan un perfil de carbonilación diferente a las ratas sanas WKY, revelando una alteración en su homeostasis redox. Este perfil de carbonilación encontrado pareció

característico de la cepa en el experimento propuesto, puesto que se mostró independiente de la composición de ácidos grasos de la dieta, mostrando perfiles similares tanto bajo la suplementación con soja como con lino en los tres tejidos analizados.

Entre las proteínas carboniladas identificadas en el hígado, ocho proteínas mostraron diferentes índices de carbonilación entre las cepas. Cabe destacar que, a pesar del menor nivel global de carbonilación en el hígado de la cepa SHROB, cuatro proteínas hepáticas incrementaron significativamente sus índices de carbonilación con respecto a la cepa control. Tres de ellas, PDI, PDIA3 y ALDH2, fueron proteínas directamente implicadas en la regulación redox *in vivo*. En concreto, la ALDH2 se encarga de la detoxificación mitocondrial de aldehídos libres como 4-HNE, siendo una enzima clave en la protección frente al riesgo cardiovascular [418]. Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral apoyan este papel, ya que no sólo la proteína ALDH2 aparece dañada en la cepa SHROB sino que, como se expondrá más adelante, también se mostró más carbonilada tras la ingesta de una dieta con un alto contenido en grasas saturadas y azúcares refinados, utilizada en el capítulo 3 de esta tesis para inducir alteraciones metabólicas en un modelo animal inicialmente sano. En conjunto, el mayor nivel de carbonilación de estas proteínas podría contribuir a amplificar el estrés oxidativo en estas ratas, acompañado por el descenso en las actividades enzimáticas de GPx y GR encontradas en el experimento. Una cuarta proteína, relacionada con la oxidación de ácidos grasos, PERC, también se mostró más oxidada en esta cepa, factor que podría contribuir a incrementar la acumulación de grasa en el hígado, en concordancia con la esteatosis hepática característica de estas ratas [349, 416].

Paralelamente, algunas proteínas en el hígado mostraron índices de carbonilación inferiores en las ratas SHROB. Estas proteínas fueron la albúmina, AKR, ADH1 y la catalasa. Tanto la albúmina como la enzima AKR, que ya mostraron su sensibilidad a ser moduladas por la composición de los ácidos grasos de la dieta en el experimento previo, también parecen implicadas en las alteraciones metabólicas presentes en la cepa SHROB. Como se discutió previamente, la AKR puede estar implicada en la defensa antioxidante del hígado, por lo que su bajo nivel de carbonilación en la cepa SHROB podría potencialmente mejorar su estatus antioxidante. Sin embargo, también es cierto que se trata de una enzima implicada en la inactivación de hormonas esteroideas en el hígado [419]. Puesto que las ratas SHROB son resistentes a leptina y esta hormona estimula la síntesis de hormonas esteroideas en el tejido adiposo [420], los niveles de hormonas sexuales en las ratas SHROB son anormalmente

bajos, provocándoles esterilidad [173]. A la vista de este dato, considerando que las ratas SHROB presentan una alteración en esta ruta metabólica, la alteración de la enzima AKR encontrada en nuestra investigación plantea la duda de si realmente es una consecuencia de una patología relacionada con el síndrome metabólico o es más bien fruto de la esterilidad asociada a la cepa.

A pesar de la deficiencia en los sistemas antioxidantes del hígado y del mayor grado de oxidación de enzimas implicados en la detoxificación redox, los datos obtenidos revelaron una menor carbonilación de otras dos enzimas implicadas en la respuesta antioxidante, la ADH1 y la catalasa. Esta aparente contradicción puede ser, en realidad, un reflejo de una “desregulación” de la homeostasis redox. De hecho, la alteración de la catalasa puede implicar cambios en los gradientes intracelulares de H_2O_2 , que actúa como mensajero secundario en la señalización de la insulina [421] y por tanto, la modificación de sus niveles celulares puede suponer una perturbación en esta ruta de señalización, acorde a la resistencia a insulina presente en la cepa SHROB. También debe considerarse que la propia carbonilación proteica podría tener un papel activo en la señalización mediada por ROS y que, consecuentemente, los diferentes estados oxidativos de proteínas específicas respecto al control sano podrían ser el reflejo de alteraciones en otras rutas celulares.

En conclusión, el perfil de carbonilación encontrado en las ratas que padecen síndrome metabólico difiere significativamente del presente en los animales sanos y establece una correlación entre el perfil de carbonilación y la manifestación del síndrome. Este hecho marca un buen punto de partida para la identificación de rutas alteradas por el síndrome metabólico y para la caracterización del proteoma redox de la cepa, de cara a ser empleada como modelo en investigaciones proteómicas.

Tras el descubrimiento de las dianas proteicas de carbonilación asociadas a un modelo animal genético de síndrome metabólico, en el capítulo 3 se realizó el estudio de los perfiles de carbonilación proteica asociados a alteraciones metabólicas cuando éstas son inducidas mediante el consumo de dietas hipercalóricas típicas de los países desarrollados.

La inducción de las alteraciones metabólicas se llevó a cabo empleando una dieta HFHS, con un alto contenido en grasa (casi un 25%), principalmente grasa procedente de la leche que contiene casi un 70% de ácidos grasos saturados [422] y un alto contenido en carbohidratos refinados, en concreto sacarosa (casi un 33%). El estudio se realizó empleando machos de la

cepa Sprague-Dawley, que al igual que la cepa WKY es también una cepa frecuentemente usada como modelo en el campo de la investigación nutricional [156, 157].

Los resultados obtenidos mostraron que el consumo de la dieta HFHS fue eficaz induciendo obesidad abdominal, hiperinsulinemia y NAFLD, además de incrementar los niveles de carbonilación proteica y peroxidación lipídica en el hígado y el plasma. Estas alteraciones forman parte de la constelación de trastornos que caracterizan al síndrome metabólico humano. Sin embargo, las ratas no desarrollaron otros trastornos que componen el síndrome, tales como la dislipidemia o la hipertensión, que sí estaban presentes en el modelo genético SHROB analizado en el capítulo 2. Por tanto, en este modelo inducido por dieta la severidad de los trastornos fue menor al observado en el modelo genético, permitiendo la evaluación de la carbonilación proteica asociada a las primeras fases del desarrollo del síndrome y de otras alteraciones vinculadas a éste, tales como la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares.

El estudio proteómico se llevó a cabo en el plasma, el hígado y el músculo esquelético, al igual que en el capítulo 2. En este caso, se realizó un fraccionamiento previo de las proteínas hepáticas y musculares según su fuerza iónica, lo que permitió una caracterización más exhaustiva de la carbonilación proteica.

Los resultados obtenidos a nivel global reflejaron una mayor carbonilación de las proteínas del plasma y del hígado en las dos fracciones estudiadas en los animales alimentados con la dieta HFHS. Sin embargo, el consumo de la dieta HFHS no incrementó la oxidación proteica en ninguna de las dos fracciones de proteínas musculares analizadas. Este patrón de carbonilación general en los diferentes tejidos fue opuesto al encontrado en el modelo genético analizado anteriormente, lo que podría corresponderse con diferentes etapas en la progresión de las alteraciones metabólicas presentes, aunque también podría ser consecuencia del origen distinto de dichas alteraciones (monogenético en la cepa SHROB o multifactorial en la cepa inducida por dieta).

El análisis de los niveles individuales de carbonilación de las proteínas permitió identificar las dianas de carbonilación asociadas a la dieta HFHS. En primer lugar, la albúmina en el plasma y en el hígado incrementó su nivel de carbonilación en las ratas alimentadas con la dieta HFHS. De nuevo, la albúmina se reveló como una proteína diana del estrés oxidativo inducido por la dieta, ya que en el primer estudio se comprobó que la suplementación con ω -6 LA ó ω -3 ALA incrementaba los niveles de oxidación de la albúmina

tanto en plasma como en hígado, en comparación con el efecto de la suplementación con EPA y DHA. En el modelo genético, su nivel de oxidación fue inferior, quizás por la hipoalbuminemia característica de estas ratas, como se discutió previamente. Considerando estos datos en su conjunto, parece que la cantidad y la calidad de la grasa de la dieta modulan el estado oxidativo de la albúmina.

En el hígado, el consumo de la dieta HFHS supuso una alteración de los niveles de carbonilación de otras ocho proteínas diferentes, cinco de ellas proteínas mitocondriales. Entre las proteínas afectadas, se observó un incremento de la carbonilación de CPSasa1, ASS, GDH1 y una reducción de la carbonilación de AST2, todas ellas proteínas implicadas en el metabolismo del nitrógeno. Recientemente, Jin y colaboradores han descubierto un papel de la GDH1 en la regulación de la homeostasis redox, a través de la activación de la enzima GPx1 [423], por lo que el aumento en la carbonilación de esta enzima causada por las dietas HFHS podría contribuir a empeorar la defensa antioxidante hepática.

La proteína CPSasa1 se reveló como una diana importante de carbonilación en el hígado. Los resultados previos descritos anteriormente ya habían mostrado su susceptibilidad a sufrir la reacción de carbonilación proteica, siendo identificada como una proteína carbonilada en el hígado tanto en las ratas WKY suplementadas con los diferentes aceites como en las ratas SHROB, aunque sus niveles de carbonilación sólo incrementaron tras el consumo de la dieta HFHS. También es interesante destacar que el consumo de esta dieta HFHS incrementó la carbonilación de la enzima ASS y redujo la carbonilación de AST2, de manera similar a lo observado a través de la suplementación con ω -6 LA sobre estas proteínas en comparación con la suplementación con EPA y DHA. Esto indica que el estado de oxidación *in vivo* de estas proteínas depende en gran medida de la composición específica de la dieta y que este efecto se repite con independencia de la cepa, el sexo y la duración del periodo experimental.

La dieta HFHS mostró una modulación opuesta a la acción de los ω -3 EPA y DHA sobre la carbonilación de determinadas proteínas (albúmina, ASS y AST), al mismo tiempo que incrementó la carbonilación de proteínas sobre las que los ω -3 marinos no mostraron ningún efecto en el modelo sano. Entre este último grupo, cabe destacar la ALDH2, que incrementó significativamente su nivel de carbonilación tras el consumo de HFHS. Como se indicó previamente, esta enzima también incrementó su nivel de carbonilación en el hígado de la cepa SHROB. Dada la importancia de la ALDH2 en la protección cardiovascular, el hecho de que incremente su nivel de carbonilación tanto en el modelo genético como en el modelo

inducido por dieta puede indicar que la carbonilación de esta proteína podría ser un factor determinante para el desarrollo de las alteraciones metabólicas encontradas en estas cepas, probablemente independiente del mecanismo inductor del trastorno y que por tanto, controlar su nivel de carbonilación puede ser clave en el diseño de estrategias encaminadas a la prevención o tratamiento de alteraciones metabólicas.

Finalmente, el fraccionamiento de la muestra permitió descubrir otras proteínas que incrementaron sus niveles de carbonilación tras el consumo de la dieta HFHS. Dichas proteínas fueron la ATP sintasa, perteneciente a la cadena mitocondrial de transporte de electrones, que se ha identificado previamente como una de las dianas del ataque de aldehídos como el 4-HNE que detoxifica la ALDH2 [418], la actina citoplasmática 1, implicada en la disfunción celular, y la regucalcina, implicada en la defensa antioxidante, ya que activa la SOD, y el metabolismo del Ca^{2+} .

En conjunto, considerando los datos bioquímicos y biométricos obtenidos en los animales alimentados con la dieta HFHS, puede concluirse que en este estudio se consiguió avanzar en la caracterización del perfil de carbonilación proteica asociado a alteraciones metabólicas tales como la obesidad abdominal, la hiperinsulinemia y el NAFLD inducidas por el consumo de estas dietas.

La investigación realizada en los primeros tres capítulos de esta tesis doctoral permitió caracterizar el proteoma redox, desde la perspectiva de la carbonilación proteica, asociado a determinados componentes de la dieta cuyo consumo se vincula a la aparición y al desarrollo de alteraciones metabólicas. En el último capítulo de esta tesis doctoral se abordó el estudio del efecto de los ω -3 PUFAs de pescado sobre otro aspecto fundamental del proteoma, la regulación de los niveles de las proteínas celulares, con el objetivo de descubrir mecanismos de acción adicionales de estos ácidos grasos sobre el metabolismo celular. Considerando los resultados previos expuestos, la proporción equitativa de EPA y DHA (1:1) fue la más efectiva reduciendo los niveles de carbonilación proteica y mejorando otros parámetros bioquímicos. Por ello, en esta parte del trabajo investigador, fue la proporción escogida para evaluar su efecto cuantitativo sobre el proteoma. Para cumplir con los objetivos propuestos, también se evaluó el efecto de la combinación de los PUFAs marinos con los polifenoles de la uva, ya que estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación demostraron su efectividad previniendo la peroxidación de los aceites de pescado y facilitando su absorción a nivel intestinal [140, 354].

Asimismo, el estudio pretendió profundizar en la posible dependencia de los mecanismos de acción de los componentes bioactivos y el tipo de dieta a la que se incorporan. Consecuentemente, el estudio se planteó en dos contextos diferentes, un contexto “sano” y uno “insano” o inductor de alteraciones metabólicas. En ambos casos, se emplearon ratas hembra WKY (la misma cepa empleada en el capítulo 1, que ya se mostró susceptible a la regulación de su proteoma redox por la composición de PUFAs de la dieta), divididas en dos grupos bien diferenciados. Para crear el contexto sano, el primer grupo se alimentó con una dieta estándar comercial como base. Para crear el contexto insano, inductor de alteraciones metabólicas, el segundo grupo se alimentó con una dieta HFHS como base (la misma que la empleada en el capítulo 3). El modelo inducido por esta dieta, si bien presenta menos alteraciones metabólicas que el modelo genético animal SHROB descrito en el segundo capítulo, muestra una naturaleza multifactorial que mimetiza mejor las alteraciones humanas. Además, la mutación en el receptor de leptina del modelo SHROB lo podría hacer portador de otras alteraciones exclusivas de esta cepa, poco susceptibles a responder al efecto del consumo de los suplementos y, por tanto, dificultar la identificación de los mecanismos de acción debidos al consumo de los omega-3 y los polifenoles.

Ambos grupos recibieron un suplemento de PUFAs de pescado, polifenoles o una combinación de ambos, utilizando como grupo control, un suplemento a base de aceite de soja, rico en ω -6 LA, que fue incluido tanto en el contexto sano como insano y que fue el grupo de referencia para hacer el análisis cuantitativo del proteoma. Este diseño experimental en el que se compararon dietas isocalóricas que se diferenciaban únicamente en la composición del suplemento (omega-6, omega-3 o mezcla de polifenoles de uva) permitió atribuir los cambios observados específicamente al suplemento y no a otros componentes de la dieta. Finalmente, el estudio se focalizó sobre las proteínas hepáticas, más concretamente sobre la fracción citosólica, ya que el hígado fue tejido diana en todos los experimentos anteriores realizados en el campo de la proteómica redox.

Mediante la aplicación de dos herramientas complementarias de la proteómica cuantitativa, iTRAQ y 2D-DIGE, se consiguió una elevada sensibilidad, especificidad y confianza de los resultados obtenidos, que indicaron que el efecto de los ω -3 y los polifenoles sobre la regulación proteica depende en gran medida del tipo de dieta a la que se incorporan. Hablando en términos absolutos, un total de 10 proteínas fueron alteradas por los suplementos en el contexto saludable, frente a las 34 alteradas en el contexto HFHS, comparando los

resultados obtenidos del análisis iTRAQ realizado en ambos contextos. Esta mayor modulación global de los compuestos bioactivos en el contexto inductor de alteraciones metabólicas podría responder a una mayor alteración del metabolismo celular en estos individuos.

Otro aspecto importante que se puso de manifiesto del análisis de los resultados fue que no solo la efectividad para inducir cambios sobre las concentraciones de las proteínas celulares depende del contexto en el que fueron administrados, sino que también los mecanismos de acción de los PUFAs marinos y de los polifenoles fueron altamente dependientes del mismo, mostrando en cada caso dianas de acción diferentes.

En ambos contextos el aceite de pescado se reveló como la principal fuerza inductora de los cambios en la concentración de proteínas específicas, mientras que los polifenoles, que por sí mismos mostraron un efecto menor, parecieron actuar más bien modulando la acción de los PUFAs cuando se suministran conjuntamente, ejerciendo un efecto sinérgico sobre determinadas proteínas y rutas bioquímicas, que fue especialmente evidente en la dieta HFHS.

En el contexto saludable, los diferentes suplementos ejercieron su acción sobre la regulación del proteoma alterando principalmente proteínas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos, las proteínas y los aminoácidos, aunque sus dianas específicas dentro de estas rutas difirieron en función de la composición del suplemento. Además, la dieta suplementada con el aceite de pescado, sin la presencia de polifenoles, alteró dos proteínas implicadas en la señalización Ras, acorde al efecto diferencial que sobre esta ruta parecen exhibir los ácidos grasos de las series ω -6 y ω -3 [368]. Por otra parte, los ω -3 reducen los niveles de dos proteínas (CSAD y GLOD4) de manera independiente de la presencia de los polifenoles, puesto que su efecto se repite en las dos dietas que incorporan estos ácidos. Cabe destacar que la enzima glicolítica ALDOA sufrió una reducción significativa de sus niveles celulares bajo la acción de los dos suplementos y su combinación, lo que podría indicar que su concentración celular es altamente susceptible a ser regulada por la composición de la dieta, al menos en el contexto saludable.

Finalmente, la identificación de las proteínas alteradas permitió detectar un posible efecto sinérgico entre los aceites de pescado y los polifenoles en el contexto sano, ya que los niveles celulares de tres proteínas disminuyeron frente al control solamente en el grupo suplementado con ambos compuestos y no se encontraron alteradas por las suplementaciones individuales. En concreto, la acción combinada de ambos compuestos fue la única capaz de reducir los

niveles celulares de una proteína implicada en el metabolismo de los lípidos, la enzima ACSL1, que juega un papel muy importante en la resistencia a insulina y la obesidad, e incluso se han identificado variantes alélicas del gen relacionadas con la predisposición a desarrollar síndrome metabólico en humanos [424].

En el contexto inductor de alteraciones metabólicas proporcionado con la dieta HFHS, las proteínas relacionadas con el metabolismo proteico y aminoacídico así como las proteínas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos, se revelaron de nuevo como dianas de la acción de los suplementos. Sin embargo, y a diferencia del contexto sano, el metabolismo de los lípidos se convirtió en este caso en una ruta metabólica notablemente influenciada por los distintos suplementos, sobre todo por los que contienen los aceites de pescado.

Así los resultados obtenidos mostraron que, con respecto al aceite rico en ω -6, el aceite de pescado fue capaz de reducir las cantidades celulares de enzimas implicadas en la síntesis, el transporte y el almacenamiento de los lípidos así como incrementar enzimas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos. Este efecto fue esencialmente independiente de los polifenoles, excepto para las enzimas implicadas en la β -oxidación mitocondrial, donde la incorporación de polifenoles al aceite de pescado potenció el efecto mostrado por dicho aceite y reveló un efecto sinérgico entre ambos sobre esta ruta.

El efecto detectado sobre el metabolismo de los lípidos evidencia el papel de los ω -3 marinos en la reducción de los niveles de SREBPs y como agonistas del PPAR- α recogido en la literatura [102]. Pero además, la reducción de los niveles de las proteínas FABP5 y ACBP encontrada tras la suplementación con el aceite de pescado podría revelar nuevos mecanismos de acción de estos ácidos, ya que se han propuesto como proteínas candidatas a ejercer como factores de transcripción implicados en la transmisión de señales al núcleo [103].

Los resultados también apoyaron el efecto inhibitorio de los ω -3 de pescado sobre los factores de transcripción HNF-4 α y ChREBP, que se han perfilado como dianas de acción de los PUFAs, ya que se encontró una reducción de enzimas controlados por estos factores tales como PKLR, implicada en la glicolisis o BAAT, implicada en la síntesis de sales biliares. La combinación con los polifenoles pareció potenciar este efecto inhibitorio sobre ChREBP, ya que se detectó una reducción de la PKLR acompañada de una reducción de los niveles de la proteína PPP2R1A, que se ha descrito como un activador de ChREBP [104]. Por tanto, nuestros resultados podrían mostrar un mecanismo alternativo por el que estos compuestos combinados regulan los niveles de ChREBP. Asimismo, PPP2R1A también está implicada en

la ruta de señalización de la insulina. Aunque las dos dietas suplementadas con aceite de pescado parecieron mejorar la señalización de la insulina, reduciendo la proteína PSM8, este efecto podría ser potenciado por la adición de los polifenoles, que también afectaron a la proteína PPP2R1A, lo que se corresponde con los menores niveles de insulina y ácidos grasos libres encontrados en este grupo respecto al control.

Un efecto notable de la administración de los aceites de pescado fue la disminución del estrés oxidativo y la mejora del sistema antioxidante (EIF4B, PTMA, CAT y CA3) acompañado de una reducción de la carbonilación proteica del hígado. Únicamente, la acción combinada del aceite con los polifenoles pareció reducir el estrés del retículo endoplásmico, ya que se detectó un incremento de los niveles de HSPA5 y una reducción de HSPA8.

Tal y como recoge la bibliografía, los aceites de pescado inhiben el factor NF- κ B, implicado en los procesos inflamatorios de la célula. En este aspecto, los resultados obtenidos mostraron que la acción combinada de PUFAs omega-3 y polifenoles disminuían los niveles de la proteína UBE2N, implicada en la inducción y expresión del factor NF- κ B. Este descubrimiento podría potencialmente revelar un mecanismo alternativo para explicar la inhibición del factor NF- κ B por parte de los aceites de pescado, que además podría estar mediado por la presencia de polifenoles en la dieta. El menor nivel detectado de la citoquina LOC679748 apoya esta inhibición. Por su parte, solo la suplementación con el aceite de pescado redujo los niveles de otras citoquinas como Nars y Yars, así como los niveles de LUM, proteína que también ha sido vinculada a los procesos inflamatorios. Finalmente, cabe destacar que de nuevo en el contexto insano, únicamente la suplementación con el aceite de pescado pareció modular la señalización Ras y que al igual que en el contexto sano, este efecto fue compensado por la adicción de los polifenoles.

Como consideración final, los resultados de la proteómica redox y la proteómica cuantitativa, reflejan que EPA y DHA son capaces de modular el proteoma celular actuando al menos a dos niveles de regulación, controlando el estado redox de las proteínas y modulando sus niveles celulares.



VI. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de la investigación llevada a cabo en esta tesis doctoral pueden resumirse en las siguientes:

1. Los ácidos grasos ω -3, EPA y DHA, reducen el nivel de carbonilación de las proteínas tisulares frente al consumo de ω -6 LA, ejerciendo un efecto protector frente a la aparición de alteraciones metabólicas. Esta eficacia para reducir los niveles de carbonilación de las proteínas del plasma, el hígado, el músculo esquelético y el riñón depende de las proporciones relativas de EPA y DHA en la dieta, siendo la proporción equitativa 1:1 la más eficaz. Asimismo, la suplementación con EPA y DHA modula de manera selectiva los niveles de carbonilación de determinadas proteínas, regulando rutas metabólicas específicas.

2. Las alteraciones metabólicas presentes en un modelo animal genético de síndrome metabólico se asocian con una alteración de los perfiles de carbonilación proteica respecto al modelo animal sano, que se caracterizan por un incremento en los niveles totales de carbonilación proteica en el músculo esquelético y una disminución de la carbonilación en el hígado y el plasma.

3. Las alteraciones metabólicas inducidas en un modelo animal por el consumo de una dieta elevada en grasas saturadas y azúcares refinados se asocian con una alteración en el perfil de carbonilación proteica respecto al modelo animal sano, que se caracteriza por un incremento en los niveles totales de carbonilación proteica en el plasma y el hígado, sin afectar a los niveles de carbonilación de las proteínas musculares.

4. El análisis del perfil de carbonilación proteica en el hígado de los dos modelos animales de alteraciones metabólicas empleados, con independencia de su origen genético o inducido por la dieta, revela una compleja modulación del proteoma redox, que se traduce en diferentes estados oxidativos de proteínas hepáticas específicas en respuesta a las alteraciones metabólicas.

5. Los ácidos grasos ω -3, EPA y DHA, alteran de manera específica las concentraciones celulares de determinadas proteínas en el hígado respecto a los ácidos grasos ω -6 y su efecto se ve modulado por la presencia de polifenoles de uva en la dieta. Este efecto de los ω -3 y los

polifenoles sobre el control de los niveles de proteínas celulares depende en gran medida del tipo de dieta a la que se incorporan. Dicha dieta condiciona la capacidad de los compuestos bioactivos para inducir cambios en las concentraciones proteicas así como altera las proteínas diana sobre las cuales ejercen su efecto modulador.

6. Los ω -3 PUFAs y los polifenoles de uva son especialmente eficaces modulando rutas metabólicas cuando se administran en un contexto inductor de alteraciones metabólicas, regulando la concentración de proteínas que conducen a una disminución de la lipogénesis, la glicolisis, el estrés del retículo endoplasmático, la inflamación y a una mejora de la sensibilidad a la insulina y de los mecanismos de defensa antioxidante.





VII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Luca F, Perry GH, Di Rienzo A. Evolutionary adaptations to dietary changes. *Annual Review of Nutrition*. 2010;30:291-314.
- [2] Valente C, Alvarez L, Marks SJ, Lopez-Parra AM, Parson W, Oosthuizen O, et al. Exploring the relationship between lifestyles, diets and genetic adaptations in humans. *BMC Genetics*. 2015;16:55.
- [3] Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, et al. Origins and evolution of the Western diet: Health implications for the 21st century. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81:341-54.
- [4] Jew S, AbuMweis SS, Jones PJH. Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention. *The Journal of Medicinal Food*. 2009;12:925-34.
- [5] O'Keefe JH, Jr., Cordain L. Cardiovascular disease resulting from a diet and lifestyle at odds with our paleolithic genome: How to become a 21st-century hunter-gatherer. *Mayo Clinic Proceedings*. 2004;79:101-8.
- [6] Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 2008;233:674-88.
- [7] Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1991;54:438-63.
- [8] Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*. 2006;354:1601-13.
- [9] Kaur N, Chugh V, Gupta AK. Essential fatty acids as functional components of foods- a review. *The Journal of Food Science and Technology*. 2014;51:2289-303.
- [10] Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: Nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2006;60:502-7.
- [11] Turner BL, Thompson AL. Beyond the paleolithic prescription: Incorporating diversity and flexibility in the study of human diet evolution. *Nutrition Reviews*. 2013;71:501-10.
- [12] Chakravarthy MV, Booth FW. Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *The Journal of Applied Physiology*. 2004; 96(1):3-10.
- [13] Sies H. Oxidative stress. Academic Press, London. 1985:1-507.
- [14] Sies H, Jones DP. Oxidative stress. 2th ed: Encyclopedia of Stress, 3, Elsevier, Amsterdam; 2007.

- [15] Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015;4:180-3.
- [16] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39:44-84.
- [17] Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
- [18] Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1990;8:95-108.
- [19] Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;899:191-208.
- [20] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120:483-95.
- [21] Noori S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Scientific Reports*. 2012;1:f413.
- [22] Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2th ed: Clarendon Press, Oxford; 1989.
- [23] Halliwell B. Albumin - An important extracellular antioxidant?. *Biochemical Pharmacology*. 1988;37:569-71.
- [24] Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed: Clarendon Press, Oxford; 2007.
- [25] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*. 2004;142:231-55.
- [26] Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;30:1191-212.
- [27] Buchanan BB, Balmer Y. Redox regulation: A broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology*. 2005;56:187-220.
- [28] Fusco D, Colloca G, Monaco MRL, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical Interventions in Aging*. 2007;2:377-87.
- [29] Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *The Journal of Nutrition*. 2005;135:969-72.

- [30] Vetrani C, Costabile G, Di Marino L, Rivellese AA. Nutrition and oxidative stress: A systematic review of human studies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2013;64:312-26.
- [31] Hutcheson R, Rocic P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. *Experimental Diabetes Research*. 2012;2012:271028.
- [32] Hopps E, Noto D, Caimi G, Aversa MR. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2010;20:72-7.
- [33] Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28:629-36.
- [34] Expert Panel on D, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (ADULT TREATMENT PANEL III). *Jama*. 2001;285:2486-97.
- [35] Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, Group IDFETFC. The metabolic syndrome - A new worldwide definition. *The Lancet*. 2005;366:1059-62.
- [36] Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging and Disease*. 2015;6:109-20.
- [37] Ando K, Fujita T. Metabolic syndrome and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;47:213-8.
- [38] Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: A unifying hypothesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008;19:491-504.
- [39] Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 2008;57:1071-7.
- [40] Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism*. 2006;55:928-34.
- [41] Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Mannheim D, McConnell JP, et al. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2007;292:H904-11.

- [42] Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, Keen CL, Jialal I. High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism*. 2008;57:867-70.
- [43] Couillard C, Ruel G, Archer WR, Pomerleau S, Bergeron J, Couture P, et al. Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90:6454-9.
- [44] Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circulation Journal*. 2006;70:1437-42.
- [45] Steffes MW, Gross MD, Lee DH, Schreiner PJ, Jacobs DR, Jr. Adiponectin, visceral fat, oxidative stress, and early macrovascular disease: The coronary artery risk development in young adults study. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:319-26.
- [46] Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *FASEB Journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;86:355-62.
- [47] Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*. 2009;84:705-12.
- [48] Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003;23:434-9.
- [49] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004;114:1752-61.
- [50] Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, et al. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *The American Journal of Pathology*. 2006;169:846-60.
- [51] Schaffer SW, Jong CJ, Mozaffari M. Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: Unifying hypothesis of diabetes revisited. *Vascular Pharmacology*. 2012;57:139-49.
- [52] Stadler K. Oxidative stress in diabetes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012;771:272-87.

- [53] Czech MP, Lawrence JC, Jr., Lynn WS. Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71:4173-7.
- [54] Higaki Y, Mikami T, Fujii N, Hirshman MF, Koyama K, Seino T, et al. Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2008;294:E889-97.
- [55] May JM, de Haen C. The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1979;254:9017-21.
- [56] Powell DJ, Hajduch E, Kular G, Hundal HS. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology*. 2003;23:7794-808.
- [57] Jaillard T, Roger M, Galinier A, Guillou P, Benani A, Leloup C, et al. Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes*. 2009;58:1544-9.
- [58] Kunitomo M, Yamaguchi Y, Kagota S, Otsubo K. Beneficial effect of coenzyme Q10 on increased oxidative and nitrative stress and inflammation and individual metabolic components developing in a rat model of metabolic syndrome. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2008;107:128-37.
- [59] Kveiborg B, Hermann TS, Major-Pedersen A, Christiansen B, Rask-Madsen C, Raunso J, et al. Metoprolol compared to carvedilol deteriorates insulin-stimulated endothelial function in patients with type 2 diabetes - A randomized study. *Cardiovascular Diabetology*. 2010;9:21.
- [60] de Oliveira J, Hort MA, Moreira EL, Glaser V, Ribeiro-do-Valle RM, Prediger RD, et al. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Neuroscience*. 2011;197:99-106.
- [61] Marques de Mattos A, Marino LV, Ovidio PP, Jordao AA, Almeida CC, Chiarello PG. Protein oxidative stress and dyslipidemia in dialysis patients. *Therapeutic Apheresis and Dialysis: Official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*. 2012;16:68-74.
- [62] Zelzer S, Fuchs N, Almer G, Raggam RB, Pruller F, Truschnig-Wilders M, et al. High density lipoprotein cholesterol level is a robust predictor of lipid peroxidation irrespective of gender, age, obesity, and inflammatory or metabolic biomarkers. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2011;412:1345-9.

- [63] Nayak DU, Karmen C, Frishman WH, Vakili BA. Antioxidant vitamins and enzymatic and synthetic oxygen-derived free radical scavengers in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Heart Disease (Hagerstown, Md)*. 2001;3:28-45.
- [64] Kizhakekuttu TJ, Widlansky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. *Cardiovascular Therapeutics*. 2010;28:e20-32.
- [65] Tse WY, Maxwell SR, Thomason H, Blann A, Thorpe GH, Waite M, et al. Antioxidant status in controlled and uncontrolled hypertension and its relationship to endothelial damage. *The Journal of Human Hypertension*. 1994;8:843-9.
- [66] Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, et al. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *Journal of Hypertension*. 1998;16:1267-71.
- [67] Kitiyakara C, Wilcox CS. Antioxidants for hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 1998;7:531-8.
- [68] Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Combination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure. *Clinical Science (London, England: 1979)*. 1997;92:361-5.
- [69] Bellisle F, Diplock AT, Hornstra G, Koletzko B, Roberfroid M, Salminen S, et al. Functional food science in Europe - Theme paper. *The British Journal of Nutrition*. 1998;80:1-193.
- [70] Diplock AT, Charuleux J-L, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *The British Journal of Nutrition*. 1998;80:S77-S112.
- [71] Brower V. Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market?. *Nature Biotechnology*. 1998;16:728-31.
- [72] Aluko RE, service) SO. Functional foods and nutraceuticals. New York, NY: Springer; 2012.
- [73] Kalra EK. Nutraceutical - Definition and introduction. *AAPS PharmSci*. 2003;5:E25.
- [74] El Sohaimy S. Functional foods and nutraceuticals - Modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal*. 2012;20:691-708.
- [75] Ackman RG. Fatty acids. In: Ackman RG, editor. Marine biogenic lipids, fats and oils, Vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.; 1989. p. 103–37.
- [76] Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008;52:885-97.

- [77] Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1999;70:560S-9S.
- [78] Shireman R, Editor-in-Chief: Caballero B. Essential fatty acids. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). Oxford: Academic Press; 2003. p. 2169-76.
- [79] Serini S, Fasano E, Piccioni E, Cittadini AR, Calviello G. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the paradox of their health benefits and potential harmful effects. *Chemical Research in Toxicology*. 2011;24:2093-105.
- [80] Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology*. 2009;77:937-46.
- [81] Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 2008;47:147-55.
- [82] Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*. 2010;2:355-74.
- [83] Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N. Physiological compartmental analysis of α -linolenic acid metabolism in adult humans. *The Journal of Lipid Research*. 2001;42:1257-65.
- [84] Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA, Millward DJ. Long-chain conversion of [13C]linoleic acid and α -linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *The Journal of Lipid Research*. 2005;46:269-80.
- [85] Brenna JT, Salem N, Jr., Sinclair AJ, Cunnane SC, International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ISSFAL. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 2009;80:85-91.
- [86] Brossard N, Croset M, Pachiaudi C, Riou JP, Tayot JL, Lagarde M. Retroconversion and metabolism of [13C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [13C]22:6n-3-triacylglycerols. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996;64:577-86.
- [87] DeLany JP, West DB. Changes in body composition with conjugated linoleic acid. *The Journal of the American College of Nutrition*. 2000;19:487s-93s.
- [88] Nettleton JA. Omega-3 fatty acids: Comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *The Journal of the American Dietetic Association*. 1991;91:331-7.
- [89] Burdge GC, Calder PC. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reproduction, Nutrition, Development*. 2005;45:581-97.

- [90] Carrillo-Tripp M, Feller SE. Evidence for a mechanism by which omega-3 polyunsaturated lipids may affect membrane protein function. *Biochemistry*. 2005;44:10164-9.
- [91] Ehringer W, Belcher D, Wassall SR, Stillwell W. A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega 3) and docosahexaenoic (22:6 omega 3) acids on phospholipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1990;54:79-88.
- [92] Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1998;14:111-36.
- [93] Liu J, Oh P, Horner T, Rogers RA, Schnitzer JE. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:7211-22.
- [94] Shaikh SR. Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary n-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23:101-5.
- [95] Ma DW, Seo J, Switzer KC, Fan YY, McMurray DN, Lupton JR, et al. n-3 PUFA and membrane microdomains: A new frontier in bioactive lipid research. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2004;15:700-6.
- [96] Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83:1505S-19S.
- [97] Bouwens M, van de Rest O, Dellschaft N, Bromhaar MG, de Groot LC, Geleijnse JM, et al. Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009;90:415-24.
- [98] Lagarde M, Calzada C, Vericel E. Pathophysiologic role of redox status in blood platelet activation. Influence of docosahexaenoic acid. *Lipids*. 2003;38:465-8.
- [99] Kelley DS, Rudolph IL. Effect of individual fatty acids of omega-6 and omega-3 type on human immune status and role of eicosanoids. *Nutrition*. 2000;16:143-5.
- [100] Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. 2001;294:1866-70.
- [101] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002;109 Suppl:S81-96.
- [102] Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *The American Journal of Cardiology*. 2006;98:27-33.
- [103] Pégrier J-P, May CL, Girard J. Control of gene expression by fatty acids. *The Journal of Nutrition*. 2004;134:2444S-9S.

- [104] Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*. 2005;87:81-6.
- [105] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;109:1125-31.
- [106] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997;89:331-40.
- [107] Deckelbaum RJ, Worgall TS, Seo T. n-3 Fatty acids and gene expression. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83:S1520-5S.
- [108] Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:23577-83.
- [109] Xu J, Teran-Garcia M, Park JH, Nakamura MT, Clarke SD. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:9800-7.
- [110] Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutrition Reviews*. 2004;62:333-9.
- [111] Pawar A, Botolin D, Mangelsdorf DJ, Jump DB. The role of liver X receptor-alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:40736-43.
- [112] Hertz R, Magenheimer J, Berman I, Bar-Tana J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 alpha. *Nature*. 1998;392:512-6.
- [113] Claudel T, Staels B, Kuipers F. The farnesoid x receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25:2020-30.
- [114] Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:7281-6.
- [115] Dentin R, Benhamed F, Pégrier J-P, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:2843-54.

- [116] Jenkinson A, Franklin MF, Wahle K, Duthie GG. Dietary intakes of polyunsaturated fatty acids and indices of oxidative stress in human volunteers. *The European Journal of Clinical Nutrition*. 1999;53:523-8.
- [117] Malaguti M, Baldini M, Angeloni C, Biagi P, Hrelia S. High-protein-PUFA supplementation, red blood cell membranes, and plasma antioxidant activity in volleyball athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2008;18:301-12.
- [118] Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: Gas Chromatography - Mass Spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Analytical Biochemistry*. 1997;245:161-6.
- [119] Suzukawa M, Abbey M, Howe PR, Nestel PJ. Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidizability, and uptake by macrophages. *The Journal of Lipid Research*. 1995;36:473-84.
- [120] Geppert J, Kraft V, Demmelmair H, Koletzko B. Microalgal docosahexaenoic acid decreases plasma triacylglycerol in normolipidaemic vegetarians: A randomised trial. *The British Journal of Nutrition*. 2006;95:779-86.
- [121] Harats D, Dabach Y, Hollander G, Ben-Naim M, Schwartz R, Berry EM, et al. Fish oil ingestion in smokers and nonsmokers enhances peroxidation of plasma lipoproteins. *Atherosclerosis*. 1991;90:127-39.
- [122] Meydani M, Natiello F, Goldin B, Free N, Woods M, Schaefer E, et al. Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. *The Journal of Nutrition*. 1991;121:484-91.
- [123] Mori TA, Beilin LJ. Omega-3 fatty acids and inflammation. *Current Atherosclerosis Reports*. 2004;6:461-7.
- [124] Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visioli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*. 2008;57:451-5.
- [125] Martorell M, Capo X, Bibiloni MM, Sureda A, Mestre-Alfaro A, Batle JM, et al. Docosahexaenoic acid supplementation promotes erythrocyte antioxidant defense and reduces protein nitrosative damage in male athletes. *Lipids*. 2015;50:131-48.
- [126] Espinosa A, Valenzuela R, Gonzalez-Manan D, D'Espessailles A, Guillermo Gormaz J, Barrera C, et al. Prevention of liver steatosis through fish oil supplementation: Correlation of oxidative stress with insulin resistance and liver fatty acid content. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2013;63:29-36.
- [127] Fisher M, Levine PH, Weiner BH, Johnson MH, Doyle EM, Ellis PA, et al. Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a

monocyte-enriched preparation of leukocytes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1990;51:804-8.

[128] FAO. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *FAO food and nutrition paper*. 2010;91:1-166.

[129] Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - The approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community dentistry and oral epidemiology. 2003;31 Suppl 1:3-23.

[130] Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, American Heart Association. Nutrition C. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106:2747-57.

[131] Simopoulos AP. Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science*. 2000;79:961-70.

[132] Foundation BBN. n-3 Fatty acids and health. *BNF:London*. 1999.

[133] Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.; 1990.

[134] Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005;45:287-306.

[135] Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*. 2003;6:291-9.

[136] Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 1992;339:1523-6.

[137] Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Grape products and cardiovascular disease risk factors. *Nutrition Research Reviews*. 2008;21:158-73.

[138] Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, De Caterina R. Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis: Focus on ω -3 polyunsaturated fatty acids and mediterranean diet polyphenols. *Cardiovascular Therapeutics*. 2010;28:e13-e9.

[139] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998;56:317-33.

[140] Maestre R, Douglass JD, Kodukula S, Medina I, Storch J. Alterations in the intestinal assimilation of oxidized PUFAs are ameliorated by a polyphenol-rich grape seed extract in an in vitro model and caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*. 2013;143:295-301.

- [141] Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *The British Journal of Pharmacology*. 1997;120:1053-8.
- [142] Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, et al. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: A role for increased nitric oxide production. *The British Journal of Pharmacology*. 1999;127:747-55.
- [143] Castilla P, Echarri R, Davalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, et al. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;84:252-62.
- [144] Castilla P, Davalos A, Teruel JL, Cerrato F, Fernandez-Lucas M, Merino JL, et al. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008;87:1053-61.
- [145] Zern TL, West KL, Fernandez ML. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *The Journal of Nutrition*. 2003;133:2268-72.
- [146] Baiges I, Palmfeldt J, Bladé C, Gregersen N, Arola L. Lipogenesis is decreased by grape seed proanthocyanidins according to liver proteomics of rats fed a high fat diet. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2010;9:1499-513.
- [147] Auger C, Rouanet JM, Vanderlinde R, Bornet A, Decorde K, Lequeux N, et al. Polyphenols-enriched Chardonnay white wine and sparkling Pinot Noir red wine identically prevent early atherosclerosis in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:9823-9.
- [148] Frederiksen H, Mortensen A, Schroder M, Frandsen H, Bysted A, Knuthsen P, et al. Effects of red grape skin and seed extract supplementation on atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007;51:564-71.
- [149] Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, et al. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17:2744-52.
- [150] Tsang C, Higgins S, Duthie GG, Duthie SJ, Howie M, Mullen W, et al. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *The British Journal of Nutrition*. 2005;93:233-40.

- [151] Abu-Amsha Caccetta R, Burke V, Mori TA, Beilin LJ, Puddey IB, Croft KD. Red wine polyphenols, in the absence of alcohol, reduce lipid peroxidative stress in smoking subjects. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;30:636-42.
- [152] Cui J, Cordis GA, Tosaki A, Maulik N, Das DK. Reduction of myocardial ischemia reperfusion injury with regular consumption of grapes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;957:302-7.
- [153] O'Byrne DJ, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids alpha-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76:1367-74.
- [154] Wang Q, Simonyi A, Li W, Sisk BA, Miller RL, Macdonald RS, et al. Dietary grape supplement ameliorates cerebral ischemia-induced neuronal death in gerbils. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005;49:443-51.
- [155] Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11:622-46.
- [156] Angelova P, Boyadjiev N. A review on the models of obesity and metabolic syndrome in rats. *Trakia Journal of Sciences*. 2013;1:5-12.
- [157] Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2011;2011:351982.
- [158] Fellmann L, Nascimento AR, Tibirica E, Bousquet P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013;137:331-40.
- [159] Aleixandre de Artinano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *The British Journal of Nutrition*. 2009;102:1246-53.
- [160] Vandamme TF. Rodent models for human diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2015;759:84-9.
- [161] Vandamme TF. Use of rodents as models of human diseases. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2014;6:2-9.
- [162] King AJF. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. 2012;166:877-94.
- [163] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-32.
- [164] Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford MLJ. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*. 1997;390:521-5.

- [165] Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;967:379-88.
- [166] Maedler K, Schulthess FT, Bielman C, Berney T, Bonny C, Prentki M, et al. Glucose and leptin induce apoptosis in human β -cells and impair glucose-stimulated insulin secretion through activation of c-Jun N-terminal kinases. *The FASEB Journal*. 2008;22:1905-13.
- [167] Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83:1263-71.
- [168] Wang M-Y, Yan TZ, Newgard CB, Unger RH. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Letters*. 1996;392:87-90.
- [169] Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AWK, Wang Y, et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*. 2003;421:856-9.
- [170] Lee G-H, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JJ, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996;379:632-5.
- [171] Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Koletsky RJ, Ernsberger P. Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides*. 1999;20:1449-53.
- [172] Koletsky S. Obese spontaneously hypertensive rats - A model for study of atherosclerosis. *Experimental and Molecular Pathology*. 1973;19:53-60.
- [173] Koletsky S. Pathologic findings and laboratory data in a new strain of obese hypertensive rats. *The American Journal of Pathology*. 1975;80:129-42.
- [174] Takaya K, Ogawa Y, Hiraoka J, Hosoda K, Yamori Y, Nakao K, et al. Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Nature Genetics*. 1996;14:130-1.
- [175] Ernsberger P, Koletsky RJ, Friedman JE. Molecular pathology in the obese spontaneous hypertensive Koletsky rat: A model of syndrome X. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999: 272-88.
- [176] Zavaroni I, Bonini L, Fantuzzi M, Dall'Aglio E, Passeri M, Reaven GM. Hyperinsulinaemia, obesity, and syndrome X. *Journal of Internal Medicine*. 1994;235:51-6.
- [177] Nilsson C, Raun K, Yan F-f, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012;33:173-81.
- [178] Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:798-808.

- [179] Moore JB, Weeks ME. Proteomics and systems biology: current and future applications in the nutritional sciences. *Advances in Nutrition*. 2011;2:355-64.
- [180] Ganesh V, Hettiarachchy NS. Nutriproteomics: A promising tool to link diet and diseases in nutritional research. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2012;1824:1107-17.
- [181] Kussmann M, Raymond F, Affolter M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *Journal of Biotechnology*. 2006;124:758-87.
- [182] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003;422:193-7.
- [183] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995;16:1090-4.
- [184] Wilkins M, Gooley A. Protein Identification in Proteome Projects. In: Wilkins M, Williams K, Appel R, Hochstrasser D, editors. *Proteome research: New frontiers in functional genomics*: Springer Berlin Heidelberg; 1997. p. 35-64.
- [185] Schweigert FJ. Nutritional proteomics: methods and concepts for research in nutritional science. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2007;51:99-107.
- [186] Panagiotou G, Nielsen J. Nutritional systems biology: Definitions and approaches. *Annual Review of Nutrition*. 2009;29:329-39.
- [187] Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1999;27:1151-63.
- [188] Butterfield DA, Dalle-Donne I. Redox proteomics. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012;17:1487-9.
- [189] Bachi A, Dalle-Donne I, Scaloni A. Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. *Chemical Reviews*. 2013;113:596-698.
- [190] Curtis JM, Hahn WS, Long EK, Burrill JS, Arriaga EA, Bernlohr DA. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2012;23:399-406.
- [191] Go Y-M, Jones DP. The redox proteome. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;288:26512-20.
- [192] Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, Milzani A. Protein S-glutathionylation: A regulatory device from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*. 2009;34:85-96.

- [193] Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, et al. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*. 2006;441:513-7.
- [194] Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011;10:R110.006924.
- [195] Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 2003;9:169-76.
- [196] Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1994;17:429-37.
- [197] Baraibar MA, Friguet B. Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Experimental Gerontology*. 2013;48:620-5.
- [198] Moller IM, Rogowska-Wrzesinska A, Rao RS. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of Proteomics*. 2011;74:2228-42.
- [199] Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993;300:535-43.
- [200] Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*. 2014;33:79-97.
- [201] Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. 2003;329:23-38.
- [202] Pun PB, Murphy MP. Pathological significance of mitochondrial glycation. *International Journal of Cell Biology*. 2012;2012:843505.
- [203] Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science*. 1992;257:1220-4.
- [204] Xie H, Vucetic S, Iakoucheva LM, Oldfield CJ, Dunker AK, Obradovic Z, et al. Functional anthology of intrinsic disorder. 3. Ligands, post-translational modifications, and diseases associated with intrinsically disordered proteins. *Journal of Proteome Research*. 2007;6:1917-32.
- [205] Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1703:93-109.
- [206] Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1773:93-104.

- [207] Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006;52:601-23.
- [208] Grimm S, Hoehn A, Davies KJ, Grune T. Protein oxidative modifications in the ageing brain: Consequence for the onset of neurodegenerative disease. *Free Radical Research*. 2011;45:73-88.
- [209] Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Moreno NR, García-Ríos A, Delgado-Casado N, Membrives A, et al. Proteasome dysfunction associated to oxidative stress and proteotoxicity in adipocytes compromises insulin sensitivity in human obesity. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015;23(7):597-612.
- [210] Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJ. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36:2519-30.
- [211] Terman A, Brunk UT. Lipofuscin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36:1400-4.
- [212] Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: A cellular response to misfolded proteins. *The Journal of Cell Biology*. 1998;143:1883-98.
- [213] Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Grune T, Davies KJ. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I - Effects of proliferative senescence. *FASEB Journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14:2495-502.
- [214] Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Davies KJ, Grune T. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II - Aging of nondividing cells. *FASEB journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14:2503-10.
- [215] Dunlop RA, Brunk UT, Rodgers KJ. Oxidized proteins: Mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB Life*. 2009;61:522-7.
- [216] Wong CM, Bansal G, Marcocci L, Suzuki YJ. Proposed role of primary protein carbonylation in cell signaling. *Redox report: Communications in Free Radical Research*. 2012;17:90-4.
- [217] Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010;12:393-404.
- [218] Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 1994;233:346-57.

- [219] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 1990. p. 464-78.
- [220] Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1997;23:361-6.
- [221] Winterbourn CC, Buss IH. Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods in Enzymology*. 1999;300:106-11.
- [222] Alamdari DH, Kostidou E, Paletas K, Sarigianni M, Konstas AG, Karapiperidou A, et al. High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2005;39:1362-7.
- [223] Rogowska-Wrzesinska A, Wojdyla K, Nedic O, Baron CP, Griffiths HR. Analysis of protein carbonylation - Pitfalls and promise in commonly used methods. *Free Radical Research*. 2014;48:1145-62.
- [224] Yan L-J, Forster MJ. Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: A review. *Journal of Chromatography B*. 2011;879:1308-15.
- [225] Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*. 1975;26:231-43.
- [226] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975;250:4007-21.
- [227] Bjellqvist B, Ek K, Giorgio Righetti P, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1982;6:317-39.
- [228] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
- [229] Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: Examination by Western blot immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994;17:429-37.
- [230] Luo S, Wehr NB. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox report: Communications in free radical research*. 2009;14:159-66.

- [231] Conrad CC, Choi J, Malakowsky CA, Talent JM, Dai R, Marshall P, et al. Identification of protein carbonyls after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*. 2001;1:829-34.
- [232] Ahn B, Rhee SG, Stadtman ER. Use of fluorescein hydrazide and fluorescein thiosemicarbazide reagents for the fluorometric determination of protein carbonyl groups and for the detection of oxidized protein on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 1987;161:245-57.
- [233] Jung Y-d, Chay K-o, Song D-u, Yang S-y, Lee M-w, Ahn B-w. Protein carbonyl formation in blood plasma by cephalosporins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997;345:311-7.
- [234] Levine RL, Stadtman ER. Carbonylated proteins and their implication in physiology and pathology. Redox Proteomics: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 123-68.
- [235] Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000;21:1037-53.
- [236] Kashino Y, Harayama T, Pakrasi HB, Satoh K. Preparation of membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 2007;849:282-92.
- [237] Abbott A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*. 1999;402:715-20.
- [238] Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*. 1996;17:813-29.
- [239] Bollineni RC, Fedorova M, Hoffmann R. Qualitative and quantitative evaluation of derivatization reagents for different types of protein-bound carbonyl groups. *Analyst*. 2013;138:5081-8.
- [240] Madian AG, Regnier FE. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *Journal of Proteome Research*. 2010;9:3766-80.
- [241] Mirzaei H, Regnier F. Affinity chromatographic selection of carbonylated proteins followed by identification of oxidation sites using tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2005;77:2386-92.
- [242] Madian AG, Myracle AD, Diaz-Maldonado N, Rochelle NS, Janle EM, Regnier FE. Differential carbonylation of proteins as a function of in vivo oxidative stress. *Journal of Proteome Research*. 2011;10:3959-72.
- [243] Ünlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 1997;18:2071-7.

- [244] Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*. 2001;1:377-96.
- [245] Alban A, David SO, Bjorkestén L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003;3:36-44.
- [246] Timms JF, Cramer R. Difference gel electrophoresis. *Proteomics*. 2008;8:4886-97.
- [247] Westermeier R, Scheibe B. Difference gel electrophoresis based on Lys/Cys tagging. *Methods in Molecular Biology*. 2008;424:73-85.
- [248] Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005;382:669-78.
- [249] Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007;389:1017-31.
- [250] Wasinger VC, Zeng M, Yau Y. Current status and advances in quantitative proteomic mass spectrometry. *International Journal of Proteomics*. 2013;2013:12.
- [251] Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology*. 2005;1:252-62.
- [252] Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: Critical review update from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012;404:939-65.
- [253] Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *The Journal of Cell Biology*. 2010;190:491-500.
- [254] Ong SE. The expanding field of SILAC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012;404:967-76.
- [255] Kruger M, Kratchmarova I, Blagoev B, Tseng YH, Kahn CR, Mann M. Dissection of the insulin signaling pathway via quantitative phosphoproteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:2451-6.
- [256] Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*. 2008;26:1367-72.

- [257] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004;3:1154-69.
- [258] Lacerda CM, Xin L, Rogers I, Reardon KF. Analysis of iTRAQ data using Mascot and Peaks quantification algorithms. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*. 2008;7:119-26.
- [259] Yao X, Afonso C, Fenselau C. Dissection of proteolytic ^{18}O labeling: Endoprotease-catalyzed ^{16}O -to- ^{18}O exchange of truncated peptide substrates. *Journal of Proteome Research*. 2003;2:147-52.
- [260] López-Ferrer D, Cañas B, Vázquez J, Lodeiro C, Rial-Otero R, Moura I, et al. Sample treatment for protein identification by mass spectrometry-based techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006;25:996-1005.
- [261] Hopps E, Caimi G. Protein oxidation in metabolic syndrome. *Clinical and Investigative Medicine*. 2013;36:E1-8.
- [262] Curtis JM, Hahn WS, Stone MD, Inda JJ, Drouillard DJ, Kuzmicic JP, et al. Protein carbonylation and adipocyte mitochondrial function. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287:32967-80.
- [263] Miyata T, Kurokawa K, Van Ypersele De Strihou C. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney International*. 2000;58:S120-S5.
- [264] Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999;48:1-9.
- [265] Oh-Ishi M, Ueno T, Maeda T. Proteomic method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2003;34:11-22.
- [266] Madian AG, Myracle AD, Diaz-Maldonado N, Rochelle NS, Janle EM, Regnier FE. Determining the effects of antioxidants on oxidative stress induced carbonylation of proteins. *Analytical Chemistry*. 2011;83:9328-36.
- [267] Bollineni RC, Fedorova M, Bluher M, Hoffmann R. Carbonylated plasma proteins as potential biomarkers of obesity induced type 2 diabetes mellitus. *Journal of Proteome Research*. 2014;13:5081-93.
- [268] Grimsrud PA, Picklo MJ, Sr., Griffin TJ, Bernlohr DA. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007;6:624-37.

- [269] Bjornsson E, Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2007;42:1023-30.
- [270] Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “hits”?. *Gastroenterology*. 114:842-5.
- [271] Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical Science* (London, England: 1979). 2004;106:261-8.
- [272] Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2001;281:G1135-9.
- [273] Hu X, Duan Z, Hu H, Li G, Yan S, Wu J, et al. Proteomic profile of carbonylated proteins in rat liver: Exercise attenuated oxidative stress may be involved in fatty liver improvement. *Proteomics*. 2013;13:1755-64.
- [274] Newton BW, Russell WK, Russell DH, Ramaiah SK, Jayaraman A. Liver proteome analysis in a rodent model of alcoholic steatosis. *Journal of Proteome Research*. 2009;8:1663-71.
- [275] Galligan JJ, Smathers RL, Fritz KS, Epperson LE, Hunter LE, Petersen DR. Protein carbonylation in a murine model for early alcoholic liver disease. *Chemical Research in Toxicology*. 2012;25:1012-21.
- [276] Deng Z, Yan S, Hu H, Duan Z, Yin L, Liao S, et al. Proteomic profile of carbonylated proteins in rat liver: Discovering possible mechanisms for tetracycline-induced steatosis. *Proteomics*. 2015;15:148-59.
- [277] Tyther R, Ahmeda A, Johns E, Sheehan D. Protein carbonylation in kidney medulla of the spontaneously hypertensive rat. *Proteomics – Clinical Applications*. 2009;3:338-46.
- [278] Park JE, Kim HT, Lee S, Lee YS, Choi UK, Kang JH, et al. Differential expression of intermediate filaments in the process of developing hepatic steatosis. *Proteomics*. 2011;11:2777-89.
- [279] Eccleston HB, Andringa KK, Betancourt AM, King AL, Mantena SK, Swain TM, et al. Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;15:447-59.
- [280] Oh TS, Kwon EY, Choi JW, Choi MS, Yun JW. Time-dependent hepatic proteome analysis in lean and diet-induced obese mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;21:1211-27.

- [281] Yamagishi N, Ueda T, Mori A, Saito Y, Hatayama T. Decreased expression of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 in liver of diabetic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;417:364-70.
- [282] Wang X, Choi JW, Joo JI, Kim DH, Oh TS, Choi DK, et al. Differential expression of liver proteins between obesity-prone and obesity-resistant rats in response to a high-fat diet. *The British Journal of Nutrition*. 2011;106:612-26.
- [283] Wang X, Choi JW, Oh TS, Choi DK, Mukherjee R, Liu H, et al. Comparative hepatic proteome analysis between lean and obese rats fed a high-fat diet reveals the existence of gender differences. *Proteomics*. 2012;12:284-99.
- [284] Li L, Lu DZ, Li YM, Zhang XQ, Zhou XX, Jin X. Proteomic analysis of liver mitochondria from rats with nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20:4778-86.
- [285] Douette P, Navet R, Gerkens P, de Pauw E, Leprince P, Sluse-Goffart C, et al. Steatosis-induced proteomic changes in liver mitochondria evidenced by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Journal of Proteome Research*. 2005;4:2024-31.
- [286] Kirpich IA, Gobejishvili LN, Bon Homme M, Waigel S, Cave M, Arteel G, et al. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2011;22:38-45.
- [287] Zhang X, Yang J, Guo Y, Ye H, Yu C, Xu C, et al. Functional proteomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease in rat models: Enoyl-coenzyme a hydratase down-regulation exacerbates hepatic steatosis. *Hepatology*. 2010;51:1190-9.
- [288] Bondia-Pons I, Boque N, Paternain L, Santamaria E, Fernandez J, Campion J, et al. Liver proteome changes induced by a short-term high-fat sucrose diet in wistar rats. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*. 2011;4:344-53.
- [289] Zhang L, Perdomo G, Kim DH, Qu S, Ringquist S, Trucco M, et al. Proteomic analysis of fructose-induced fatty liver in hamsters. *Metabolism*. 2008;57:1115-24.
- [290] Midha MK, Tikoo K, Sinha N, Kaur S, Verma HN, Rao KV, et al. Extracting time-dependent obese-diabetic specific networks in hepatic proteome analysis. *Journal of Proteome Research*. 2012;11:6030-43.
- [291] Guo Y, Darshi M, Ma Y, Perkins GA, Shen Z, Haushalter KJ, et al. Quantitative proteomic and functional analysis of liver mitochondria from high fat diet (HFD) diabetic mice. *Molecular & cellular proteomics*. 2013;12:3744-58.
- [292] Nesteruk M, Hennig EE, Mikula M, Karczmariski J, Dzwonek A, Goryca K, et al. Mitochondrial-related proteomic changes during obesity and fasting in mice are greater in the liver than skeletal muscles. *Functional & Integrative Genomics*. 2014;14:245-59.

- [293] Xu L, Wei Y, Dong D, Yin L, Qi Y, Han X, et al. iTRAQ-based proteomics for studying the effects of dioscin against nonalcoholic fatty liver disease in rats. *RSC Advances*. 2014;4:30704-11.
- [294] Sejersen H, Sorensen MT, Larsen T, Bendixen E, Ingvarsen KL. Liver protein expression in young pigs in response to a high-fat diet and diet restriction. *Journal of Animal Science*. 2013;91:147-58.
- [295] Sabido E, Wu Y, Bautista L, Porstmann T, Chang CY, Vitek O, et al. Targeted proteomics reveals strain-specific changes in the mouse insulin and central metabolic pathways after a sustained high-fat diet. *Molecular Systems Biology*. 2013;9:681.
- [296] Liao BM, Raddatz K, Zhong L, Parker BL, Raftery MJ, Schmitz-Peiffer C. Proteomic analysis of livers from fat-fed mice deficient in either PKC delta or PKC epsilon identifies Httip2 as a regulator of lipid metabolism. *Proteomics*. 2014;14:2578-87.
- [297] Kim SW, Park TJ, Choi JH, Aseer KR, Choi JY, Kim YJ, et al. Differential protein expression in white adipose tissue from obesity-prone and obesity-resistant mice in response to high fat diet and anti-obesity herbal medicines. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2015;35:1482-98.
- [298] Andrade JM, Lemos Fde O, da Fonseca Pires S, Millan RD, de Sousa FB, Guimaraes AL, et al. Proteomic white adipose tissue analysis of obese mice fed with a high-fat diet and treated with oral angiotensin-(1-7). *Peptides*. 2014;60:56-62.
- [299] Jiang L, Wang Q, Yu Y, Zhao F, Huang P, Zeng R, et al. Leptin contributes to the adaptive responses of mice to high-fat diet intake through suppressing the lipogenic pathway. *PLoS One*. 2009;4:e6884.
- [300] Joo JI, Oh TS, Kim DH, Choi DK, Wang X, Choi JW, et al. Differential expression of adipose tissue proteins between obesity-susceptible and -resistant rats fed a high-fat diet. *Proteomics*. 2011;11:1429-48.
- [301] Choi DK, Oh TS, Choi JW, Mukherjee R, Wang X, Liu H, et al. Gender difference in proteome of brown adipose tissues between male and female rats exposed to a high fat diet. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2011;28:933-48.
- [302] Mukherjee R, Choi JW, Choi DK, Oh TS, Liu H, Yun JW. Gender-dependent protein expression in white adipose tissues of lean and obese rats fed a high fat diet. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2012;29:617-34.

- [303] Joo JI, Kim DH, Choi JW, Yun JW. Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. *Journal of Proteome Research*. 2010;9:2977-87.
- [304] Salgado-Somoza A, Teijeira-Fernandez E, Fernandez AL, Gonzalez-Juanatey JR, Eiras S. Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2010;299:H202-9.
- [305] Alfadda AA, Benabdelkamel H, Masood A, Moustafa A, Sallam R, Bassas A, et al. Proteomic analysis of mature adipocytes from obese patients in relation to aging. *Experimental Gerontology*. 2013;48:1196-203.
- [306] Perez-Perez R, Ortega-Delgado FJ, Garcia-Santos E, Lopez JA, Camafeita E, Ricart W, et al. Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unlike biochemical and metabolic properties. *Journal of Proteome Research*. 2009;8:1682-93.
- [307] Insenser M, Montes-Nieto R, Vilarrasa N, Lecube A, Simo R, Vendrell J, et al. A non-targeted proteomic approach to the study of visceral and subcutaneous adipose tissue in human obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;363:10-9.
- [308] Li J, Zhao WG, Shen ZF, Yuan T, Liu SN, Liu Q, et al. Comparative proteome analysis of brown adipose tissue in obese C57BL/6J mice using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *PLoS One*. 2015;10:e0119350.
- [309] Ho JH, Lee OK, Fu YJ, Shih HT, Tseng CY, Chung CC, et al. An iTRAQ proteomic study reveals an association between diet-induced enhanced fatty acid metabolism and the development of glucose intolerance in prediabetic mice. *Journal of Proteome Research*. 2013;12:1120-33.
- [310] Ye F, Zhang H, Yang YX, Hu HD, Sze SK, Meng W, et al. Comparative proteome analysis of 3T3-L1 adipocyte differentiation using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011;112:3002-14.
- [311] Ding Y, Wu Y, Zeng R, Liao K. Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2012;44:394-406.
- [312] Berti DA, Russo LC, Castro LM, Cruz L, Gozzo FC, Heimann JC, et al. Identification of intracellular peptides in rat adipose tissue: Insights into insulin resistance. *Proteomics*. 2012;12:2668-81.
- [313] Kim DH, Choi JW, Joo JI, Wang X, Choi DK, Oh TS, et al. Changes in expression of skeletal muscle proteins between obesity-prone and obesity-resistant rats induced by a high-fat diet. *Journal of Proteome Research*. 2011;10:1281-92.

- [314] Oh TS, Choi JW, Choi DK, Mukherjee R, Liu H, Yun JW. Gender dimorphism in skeletal muscle proteome between lean and diet-induced obese rats. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2011;28:981-96.
- [315] Kim DH, Joo JI, Choi JW, Yun JW. Differential expression of skeletal muscle proteins in high-fat diet-fed rats in response to capsaicin feeding. *Proteomics*. 2010;10:2870-81.
- [316] Huang ZY, Yang PY, Almofti MR, Yu YL, Rui YC, Yang PY. Comparative analysis of the proteome of left ventricular heart of arteriosclerosis in rat. *Life Sciences*. 2004;75:3103-15.
- [317] Modrego J, de las Heras N, Zamorano-León JJ, Mateos-Cáceres PJ, Martín-Fernández B, Valero-Muñoz M, et al. Changes in cardiac energy metabolic pathways in overweighted rats fed a high-fat diet. *European Journal of Nutrition*. 2013;52:847-56.
- [318] Littlejohns B, Pasdois P, Duggan S, Bond AR, Heesom K, Jackson CL, et al. Hearts from mice fed a non-obesogenic high-fat diet exhibit changes in their oxidative state, calcium and mitochondria in parallel with increased susceptibility to reperfusion injury. *PLoS One*. 2014;9:e100579.
- [319] Cruz-Topete D, List EO, Okada S, Kelder B, Kopchick JJ. Proteomic changes in the heart of diet-induced pre-diabetic mice. *Journal of Proteomics*. 2011;74:716-27.
- [320] Choi JW, Wang X, Joo JI, Kim DH, Oh TS, Choi DK, et al. Plasma proteome analysis in diet-induced obesity-prone and obesity-resistant rats. *Proteomics*. 2010;10:4386-400.
- [321] Liu H, Choi JW, Yun JW. Gender differences in rat plasma proteome in response to high-fat diet. *Proteomics*. 2012;12:269-83.
- [322] Choi JW, Liu H, Choi DK, Oh TS, Mukherjee R, Yun JW. Profiling of gender-specific rat plasma proteins associated with susceptibility or resistance to diet-induced obesity. *Journal of Proteomics*. 2012;75:1386-400.
- [323] Okada S, List EO, Sankaran S, Kopchick JJ. Plasma protein biomarkers correlated with the development of diet-induced type 2 diabetes in mice. *Clinical Proteomics*. 2010;6:6-17.
- [324] Jing L, Parker CE, Seo D, Hines MW, Dicheva N, Yu Y, et al. Discovery of biomarker candidates for coronary artery disease from an APOE-knock out mouse model using iTRAQ-based multiplex quantitative proteomics. *Proteomics*. 2011;11:2763-76.
- [325] Oberbach A, Bluher M, Wirth H, Till H, Kovacs P, Kullnick Y, et al. Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. *Journal of Proteome Research*. 2011;10:4769-88.

- [326] de Roos B, Wanders AJ, Wood S, Horgan G, Rucklidge G, Reid M, et al. A high intake of industrial or ruminant trans fatty acids does not affect the plasma proteome in healthy men. *Proteomics*. 2011;11:3928-34.
- [327] Camargo A, Rangel-Zúñiga OA, Pena-Orihuela P, Marín C, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, et al. Postprandial changes in the proteome are modulated by dietary fat in patients with metabolic syndrome. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24:318-24.
- [328] Rangel-Zúñiga OA, Camargo A, Marín C, Pena-Orihuela P, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, et al. Proteome from patients with metabolic syndrome is regulated by quantity and quality of dietary lipids. *BMC Genomics*. 2015;16:509.
- [329] Wrzesinski K, León I, Kulej K, Sprenger RR, Bjørndal B, Christensen BJ, et al. Proteomics identifies molecular networks affected by tetradecylthioacetic acid and fish oil supplemented diets. *Journal of Proteomics*. 2013;84:61-77.
- [330] Mavrommatis Y, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, Gordon MJ, et al. Intervention with fish oil, but not with docosahexaenoic acid, results in lower levels of hepatic soluble epoxide hydrolase with time in apoE knockout mice. *The British Journal of Nutrition*. 2010;103:16-24.
- [331] de Roos B, Geelen A, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, et al. Identification of potential serum biomarkers of inflammation and lipid modulation that are altered by fish oil supplementation in healthy volunteers. *Proteomics*. 2008;8:1965-74.
- [332] Liu Z, Lin Y, Zhang S, Wang D, Liang Q, Luo G. Comparative proteomic analysis using 2DE-LC-MS/MS reveals the mechanism of Fuzhuan brick tea extract against hepatic fat accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Electrophoresis*. 2015;36:2002-16.
- [333] Li BY, Cheng M, Gao HQ, Ma YB, Xu L, Li XH, et al. Back-regulation of six oxidative stress proteins with grape seed proanthocyanidin extracts in rat diabetic nephropathy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008;104:668-79.
- [334] Zhang Z, Li BY, Li XL, Cheng M, Yu F, Lu WD, et al. Proteomic analysis of kidney and protective effects of grape seed procyanidin B2 in db/db mice indicate MFG-E8 as a key molecule in the development of diabetic nephropathy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1832:805-16.
- [335] Li XL, Li BY, Gao HQ, Cheng M, Xu L, Li XH, et al. Proteomics approach to study the mechanism of action of grape seed proanthocyanidin extracts on arterial remodeling in diabetic rats. *International Journal of Molecular Medicine*. 2010;25:237-48.
- [336] Li M, Ma YB, Gao HQ, Li BY, Cheng M, Xu L, et al. A novel approach of proteomics to study the mechanism of action of grape seed proanthocyanidin extracts on diabetic retinopathy in rats. *Chinese Medical Journal*. 2008;121:2544-52.

- [337] Deshane J, Chaves L, Sarikonda KV, Isbell S, Wilson L, Kirk M, et al. Proteomics analysis of rat brain protein modulations by grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52:7872-83.
- [338] Cedo L, Castell-Auvi A, Pallares V, Ubaida Mohien C, Baiges I, Blay M, et al. Pancreatic islet proteome profile in Zucker fatty rats chronically treated with a grape seed procyanidin extract. *Food Chemistry*. 2012;135:1948-56.
- [339] Yu F, Li B-y, Li X-l, Cai Q, Zhang Z, Cheng M, et al. Proteomic analysis of aorta and protective effects of grape seed procyanidin B2 in db/db mice reveal a critical role of milk fat globule epidermal growth factor-8 in diabetic arterial damage. *PLoS ONE*. 2012;7:e52541.
- [340] Luan SS, Yu F, Li BY, Qin RJ, Li XL, Cai Q, et al. Quantitative proteomics study of protective effects of grape seed procyanidin B2 on diabetic cardiomyopathy in db/db mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014;78:1577-83.
- [341] Aalinkeel R, Bindukumar B, Reynolds JL, Sykes DE, Mahajan SD, Chadha KC, et al. The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *The Prostate*. 2008;68:1773-89.
- [342] Mullen W, Gonzalez J, Siwy J, Franke J, Sattar N, Mullan A, et al. A pilot study on the effect of short-term consumption of a polyphenol rich drink on biomarkers of coronary artery disease defined by urinary proteomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:12850-7.
- [343] Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: The emerging faces of nutrition. *The FASEB Journal*. 2005;19:1602-16.
- [344] Hibbeln JR, Nieminen LR, Blasbalg TL, Riggs JA, Lands WE. Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83:S1483-93S.
- [345] Cottin SC, Sanders TA, Hall WL. The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2011;70:215-31.
- [346] Mori TA, Woodman RJ, Burke V, Puddey IB, Croft KD, Beilin LJ. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003;35:772-81.
- [347] Méndez L, Pazos M, Gallardo JM, Torres JL, Pérez-Jiménez J, Nogués R, et al. Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine omega-3 PUFAs. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2013;55:8-20.
- [348] Lluís L, Taltavull N, Muñoz-Cortés M, Sánchez-Martos V, Romeu M, Giralt M, et al. Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic

acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids in Health and Disease*. 2013;12:140.

[349] Taltavull N, Munoz-Cortes M, Lluís L, Jove M, Fortuno A, Molinar-Toribio E, et al. Eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid 1:1 ratio improves histological alterations in obese rats with metabolic syndrome. *Lipids in Health and Disease*. 2014;13:31.

[350] Molinar-Toribio E, Pérez-Jiménez J, Ramos-Romero S, Romeu M, Giralt M, Taltavull N, et al. Effect of n-3 PUFA supplementation at different EPA:DHA ratios on the spontaneously hypertensive obese rat model of the metabolic syndrome. *The British Journal of Nutrition*. 2015;113:878-87.

[351] Feillet-Coudray C, Aoun M, Fouret G, Bonafos B, Ramos J, Casas F, et al. Effects of long-term administration of saturated and n-3 fatty acid-rich diets on lipid utilization and oxidative stress in rat liver and muscle tissues. *The British Journal of Nutrition*. 2013;110:1789-802.

[352] Méndez L, Pazos M, Molinar-Toribio E, Sánchez-Martos V, Gallardo JM, Nogués MR, et al. Protein carbonylation associated to high-fat, high-sucrose diet and its metabolic effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2014;25:1243-53.

[353] Singh SP, Niemczyk M, Zimniak L, Zimniak P. Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* triggered by the electrophilic lipid peroxidation product 4-Hydroxynonenal (4-HNE). *Aging*. 2009;1:68-80.

[354] Pazos M, Gallardo JM, Torres JL, Medina I. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*. 2005;92:547-57.

[355] Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical Chemistry*. 1973;19:476-82.

[356] Young DS, Friedman RB. Effects of disease on clinical laboratory tests. Washington, DC: AACC Press. 2001.

[357] Sharp P, Rainbow S. Continuous glucose monitoring and haemoglobin A(1c). *Annals of Clinical Biochemistry*. 2002;39:516-7.

[358] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985;150:76-85.

[359] Li LO, Ellis JM, Paich HA, Wang S, Gong N, Altshuller G, et al. Liver-specific loss of long chain acyl-CoA synthetase-1 decreases triacylglycerol synthesis and β -oxidation and alters phospholipid fatty acid composition. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:27816-26.

- [360] Mashek DG, Li LO, Coleman RA. Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *The Journal of Lipid Research*. 2006;47:2004-10.
- [361] Penhoet E, Rajkumar T, Rutter WJ. Multiple forms of fructose diphosphate aldolase in mammalian tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1966;56:1275-82.
- [362] Yañez AJ, Ludwig HC, Bertinat R, Spichiger C, Gatica R, Berlien G, et al. Different involvement for aldolase isoenzymes in kidney glucose metabolism: Aldolase B but not aldolase A colocalizes and forms a complex with FBPase. *The Journal of Cellular Physiology*. 2005;202:743-53.
- [363] Yu Y-H, Chang Y-C, Su T-H, Nong J-Y, Li C-C, Chuang L-M. Prostaglandin reductase-3 negatively modulates adipogenesis through regulation of PPAR γ activity. *The Journal of Lipid Research*. 2013;54:2391-9.
- [364] Jerkins AA, Jones DD, Kohlhepp EA. Cysteine sulfinic acid decarboxylase mRNA abundance decreases in rats fed a high-protein diet. *The Journal of Nutrition*. 1998;128:1890-5.
- [365] Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 1995;15:133-59.
- [366] Abe Y, Yoon S-O, Kubota K, Mendoza MC, Gygi SP, Blenis J. p90 ribosomal S6 kinase and p70 Ribosomal S6 kinase link phosphorylation of the eukaryotic chaperonin containing TCP-1 to growth factor, insulin, and nutrient signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:14939-48.
- [367] Kim MM, Wiederschain D, Kennedy D, Hansen E, Yuan ZM. Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP). *Oncogene*. 2007;26:4209-15.
- [368] Collett ED, Davidson LA, Fan Y-Y, Lupton JR, Chapkin RS. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2001;280:C1066-C75.
- [369] Khan N, Mukhtar H. Modulation of signaling pathways in prostate cancer by green tea polyphenols. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(5):667-72.
- [370] Renaud HJ, Cui JY, Lu H, Klaassen CD. Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in mouse liver - Insights into mechanisms of hepatic steatosis. *PLoS ONE*. 2014;9:e88584.

- [371] Waller-Evans H, Hue C, Fearnside J, Rothwell AR, Lockstone HE, Caldérari S, et al. Nutrigenomics of high fat diet induced obesity in mice suggests relationships between susceptibility to fatty liver disease and the proteasome. *PLoS ONE*. 2013;8:e82825.
- [372] Ide T. Interaction of fish oil and conjugated linoleic acid in affecting hepatic activity of lipogenic enzymes and gene expression in liver and adipose tissue. *Diabetes*. 2005;54:412-23.
- [373] Rho HK, Park J, Suh JH, Kim JB. Transcriptional regulation of mouse 6-phosphogluconate dehydrogenase by ADD1/SREBP1c. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;332:288-96.
- [374] Hoekstra M, Stitzinger M, van Wanrooij EJA, Michon IN, Kruijt JK, Kamphorst J, et al. Microarray analysis indicates an important role for FABP5 and putative novel FABPs on a Western-type diet. *The Journal of Lipid Research*. 2006;47:2198-207.
- [375] Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T, Arkkila P, Sirén J, Hamsten A, et al. Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes*. 2007;56:2759-65.
- [376] Oikari S, Ahtialansaari T, Heinonen M, Mauriala T, Auriola S, Kiehne K, et al. Downregulation of PPARs and SREBP by acyl-CoA-binding protein overexpression in transgenic rats. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 2008;456:369-77.
- [377] Bhuiyan J, Pritchard PH, Pande SV, Secombe DW. Effects of high-fat diet and fasting on levels of acyl-coenzyme a binding protein in liver, kidney, and heart of rat. *Metabolism*. 1995;44:1185-9.
- [378] Yang Y, Pritchard PH, Bhuiyan J, Secombe D, Moghadasian M. Overexpression of acyl-CoA binding protein and its effects on the flux of free fatty acids in McA-RH 7777 cells. *Lipids*. 2001;36:595-600.
- [379] Shoukry K, Schulz H. Significance of the reductase-dependent pathway for the β -oxidation of unsaturated fatty acids with odd-numbered double bonds: Mitochondrial metabolism of 2-trans-5-cis-octadienoyl-CoA. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:6892-9.
- [380] Gurvitz A, Mursula AM, Yagi AI, Hartig A, Ruis H, Rottensteiner H, et al. Alternatives to the isomerase-dependent pathway for the β -Oxidation of oleic acid are dispensable in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of yor180c/dci1 encoding peroxisomal $\Delta 3,5$ - $\Delta 2,4$ -dienoyl-CoA isomerase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:24514-21.
- [381] Fitch WM, Chaikoff IL. Extent and patterns of adaptation of enzyme activities in livers of normal rats fed diets high in glucose and fructose. *The Journal of Biological Chemistry*. 1960;235:554-7.

- [382] Vari IS, Balkau B, Kettaneh A, André P, Tichet J, Fumeron F, et al. Ferritin and transferrin are associated with metabolic syndrome abnormalities and their change over time in a general population: data from an epidemiological study on the insulin resistance syndrome (DESIR). *Diabetes Care*. 2007;30:1795-801.
- [383] Inoue Y, Yu A-M, Yim SH, Ma X, Krausz KW, Inoue J, et al. Regulation of bile acid biosynthesis by hepatocyte nuclear factor 4 α . *The Journal of Lipid Research*. 2006;47:215-27.
- [384] Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010;21:781-92.
- [385] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806.
- [386] Mokas S, Mills JR, Garreau C, Fournier M-J, Robert F, Arya P, et al. Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Molecular Biology of the Cell*. 2009;20:2673-83.
- [387] Armutcu F, Coskun Ö, Gürel A, Kanter M, Can M, Ucar F, et al. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clinical Biochemistry*. 2005;38:540-7.
- [388] Räisänen SR, Lehenkari P, Tasanen M, Rahkila P, Härkönen PL, Väänänen HK. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *The FASEB Journal*. 1999;13:513-22.
- [389] Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): A key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochemical Pharmacology*. 2002;63:2075-80.
- [390] Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, et al. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24:8778-89.
- [391] Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*. 2000;2:326-32.
- [392] Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of Cell Biology*. 2012;197:857-67.
- [393] Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *The EMBO Journal*. 1992;11:1563-71.

- [394] Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething MJ, Mori K. The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biology*. 1993;13:877-90.
- [395] Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119:1201-15.
- [396] Meneses-Lorente G, Watt A, Salim K, Gaskell SJ, Muniappa N, Lawrence J, et al. Identification of early proteomic markers for hepatic steatosis. *Chemical Research in Toxicology*. 2006;19:986-98.
- [397] Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009;11:2307-16.
- [398] Cheng J, Fan YH, Xu X, Zhang H, Dou J, Tang Y, et al. A small-molecule inhibitor of UBE2N induces neuroblastoma cell death via activation of p53 and JNK pathways. *Cell Death & Disease*. 2014;5:e1079.
- [399] Atsumi T, Cho Y-R, Leng L, McDonald C, Yu T, Danton C, et al. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. *The Journal of Immunology*. 2007;179:5399-406.
- [400] Biswas N, Friese RS, Gayen JR, Bandyopadhyay G, Mahata SK, O'Connor DT. Discovery of a novel target for the dysglycemic chromogranin A fragment pancreastatin: Interaction with the chaperone GRP78 to influence metabolism. *PLoS ONE*. 2014;9:e84132.
- [401] Xu F, Chen Y, Lv R, Zhang H, Tian H, Bian Y, et al. ALDH2 genetic polymorphism and the risk of type II diabetes mellitus in CAD patients. *Hypertension Research*. 2010;33:49-55.
- [402] Brown MV, Reader JS, Tzima E. Mammalian aminoacyl-tRNA synthetases: Cell signaling functions of the protein translation machinery. *Vascular Pharmacology*. 2010;52:21-6.
- [403] Costa M, Ochem A, Falaschi A, Staub A. Human DNA helicase VIII: A DNA and RNA helicase corresponding to the G3BP protein, an element of the Ras transduction pathway. *Nucleic Acids Research*. 1999;27:817-21.
- [404] Blanc M, Blaskovic S, van der Goot FG. Palmitoylation, pathogens and their host. *Biochemical Society Transactions*. 2013;41:84-8.

- [405] Homma D, Katoh S, Tokuoka H, Ichinose H. The role of tetrahydrobiopterin and catecholamines in the developmental regulation of tyrosine hydroxylase level in the brain. *Journal of Neurochemistry*. 2013;126:70-81.
- [406] Xie L, Tsapralis G, Chen QM. Proteomic identification of insulin-like growth factor-binding protein-6 induced by sublethal H₂O₂ stress from human diploid fibroblasts. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005;4:1273-83.
- [407] Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. 1996;16:33-50.
- [408] Griffiths HR. Antioxidants and protein oxidation. *Free Radical Research*. 2000;33 Suppl:S47-58.
- [409] Chaudhuri AR, de Waal EM, Pierce A, Van Remmen H, Ward WF, Richardson A. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2006;127:849-61.
- [410] Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2001;17:189-212.
- [411] Hassan A, Ibrahim A, Mbodji K, Coeffier M, Ziegler F, Bounoure F, et al. An alpha-linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF-kappaB in rats with TNBS-induced colitis. *The Journal of Nutrition*. 2010;140:1714-21.
- [412] Poudyal H, Panchal SK, Ward LC, Brown L. Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24:1041-52.
- [413] Di Nunzio M, Valli V, Bordoni A. Pro- and anti-oxidant effects of polyunsaturated fatty acid supplementation in HepG2 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 2011;85:121-7.
- [414] DelBello B, Maellaro E, Sugherini L, Santucci A, Comporti M, Casini AF. Purification of NADPH-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver and its identification with 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 1994;304:385-90.
- [415] Penning TM, Mukharji I, Barrows S, Talalay P. Purification and properties of a 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase of rat liver cytosol and its inhibition by anti-inflammatory drugs. *Biochemical Journal*. 1984;222:601-11.
- [416] Molinar-Toribio E, Pérez-Jiménez J, Ramos-Romero S, Lluís L, Sánchez-Martos V, Taltavull N, et al. Cardiovascular disease-related parameters and oxidative stress in SHROB rats, a model for metabolic syndrome. *PLoS ONE*. 2014;9:e104637.

- [417] Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernández V, Tapia G, Quiñones L, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical Science* (London, England: 1979). 2004; 106(3):261-8.
- [418] Chen CH, Sun L, Mochly-Rosen D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovascular Research*. 2010;88:51-7.
- [419] Penning TM, Pawlowski JE, Schlegel BP, Jez JM, Lin H-K, Hoog SS, et al. Mammalian 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids*. 1996;61:508-23.
- [420] Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2002;26:1407-33.
- [421] Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014;289:8735-41.
- [422] Månsson HL. Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research*. 2008;52:10.3402/fnr.v52i0.1821.
- [423] Jin L, Li D, Alesi GN, Fan J, Kang HB, Lu Z, et al. Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth. *Cancer cell*. 2015;27:257-70.
- [424] Phillips CM, Goumidi L, Bertrais S, Field MR, Cupples LA, Ordovas JM, et al. Gene-nutrient interactions with dietary fat modulate the association between genetic variation of the ACSL1 gene and metabolic syndrome. *The Journal of Lipid Research*. 2010;51:1793-800.



ANEXO 1:

Material suplementario del Capítulo 2 de la sección IV RESULTADOS

Supplemental Table S1. Carbonylated proteins identified in liver and skeletal muscle.

The table lists all protein spots and identification data obtained when tandem MS data of the two tissue studied, L=liver and M=muscle, were searched against the UniprotKB database for taxonomy *Rattus*.

UniprotKB Code, Gene Name and Protein description are from UniprotKB rat database.

Protein score is the protein identification score obtained from the Sequest HT searches. # PSMs are the number of true positive peptide spectrum matches found for the protein.

Coverage value indicates the percentage of the protein's amino acid sequence identified from the MS data according to Sequest HT. # peptides is the number of peptides identified with FDR<0.01. Peptide list for the identified proteins are showed in supplemental Table S2.

Spot N°	Tissue	UniprotK B Code	Gene Name	Description	Sequest HT Score	# PSMs	# Peptides	Coverage (%)	AAs	Mw (kDa)	calc pI
1	L	P07756	Cps1	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	4271	1219	33	29,9	1500	164,5	6,8
2	L	P02770	Alb	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	2604	712	20	42,1	608	68,7	6,5
3	L	P63039	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	2448	709	18	45,4	573	60,9	6,2
4	L	P04785	P4hb	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2 - [PDIA1_RAT]	220	66	9	20,2	509	56,9	4,9
5	L	P11884	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	2067	536	15	46,7	519	56,5	7,0
6	L	P60711	Actb	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	1423	372	11	38,7	375	41,7	5,5
7	L	P50137	Tkt	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	1161	372	12	22,6	623	67,6	7,5
8	L	P04762	Cat	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	3427	851	20	57,1	527	59,7	7,5
9	L	P11598	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2 - [PDIA3_RAT]	74	22	6	14,9	505	56,6	6,2
10	L	O88618	Ftcd	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	301	84	10	23,8	541	58,9	6,1
11	L	P10860	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	1241	306	15	33,9	558	61,4	8,0
12	L	P22791	Hmgcs2	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	781	210	6	13,2	508	56,9	8,7
12	L	O09171	Bhmt	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	120	28	6	27,5	407	44,9	7,9
13	L	G3V9U2	Hmgcs2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	2053	465	13	61,6	396	41,8	8,1
13	L	O09171	Bhmt	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	1087	265	12	49,4	407	44,9	7,9
13	L	P22791	Acaa2	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	514	113	5	11,4	508	56,9	8,7

Spot N°	Tissue	Uniprot KB Code	Gene Name	Description	Sequest HT Score	# PSMs	# Peptides	Coverage (%)	AAs	Mw (kDa)	calc pI
14	L	P00507	Got2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	1331	350	11	28,4	430	47,3	9,0
15	L	P06757	Adh1	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	1792	426	12	50,0	376	39,6	8,2
16	L	P23457	Akr1c9	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c9 PE=1 SV=1 - [DIDH_RAT]	403	109	7	24,8	322	37,0	7,1
17	L	P14604	Echs1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1 - [ECHM_RAT]	978	277	6	25,5	290	31,5	8,1
18	L	Q9WVK3	Pecr	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	147	40	5	23,8	303	32,4	8,7
19	M	G3V8V3	Pygm	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	2995	806	16	27,8	842	97,2	7,1
20	M	P02770	Alb	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	1834	605	13	29,8	608	68,7	6,5
21	M	Q499Q4	Pgm1	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	3247	1035	15	42,2	562	61,4	6,6
22	M	P11980	Pkm	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	3842	1086	20	47,7	531	57,8	7,1
23	M	P15429	Eno3	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	4580	1302	15	50,2	434	47,0	7,4
24	M	P00564	Ckm	Creatine kinase M-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckm PE=1 SV=2 - [KCRM_RAT]	1954	446	6	20,7	381	43,0	7,1
25	M	P05065	Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	4143	1263	10	36,0	364	39,3	8,1
26	M	P05065	Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	5874	1574	10	44,0	364	39,3	8,1
27	M	P04797	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	3109	719	12	49,6	333	35,8	8,0
28	M	P04797	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	6933	2026	14	67,6	333	35,8	8,0
29	M	P48500	Tpi1	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	3905	940	12	63,5	249	26,8	7,2
30	M	P48500	Tpi1	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	2412	619	11	56,2	249	26,8	7,2

Supplemental Table S2. Peptide list for identified proteins in liver and skeletal muscle.

The table lists all peptide sequences found for identified proteins of the two tissue studied, T= tissue, L=liver and M=muscle.

XCorr value is the score of the cross-correlation of the each peptide match with the theoretical spectrum from the Sequest HT searches. # PSMs are the number of true positive peptide spectrum matches found for the sequence.

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
1	L	GQILTMANPIIINGGAPDPTAR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	19	1	1	P07756		5,76	2	2167,86	0
1	L	TVLMNPNIASVQTNEVGLK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	14	1	1	P07756		5,49	2	2028,52	0
1	L	IAPSFVESMEDALK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	50	1	1	P07756		5,13	2	1610,07	0
1	L	SAYALGGLSGlCPNK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	62	1	1	P07756	C13(Carbamidomethyl)	5,13	2	1565,21	0
1	L	VLGTSVESIMATEDR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	50	1	1	P07756		5,08	2	1610,02	0
1	L	GQILTMANPIIINGGAPDPTAR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	4	1	1	P07756	M6(Oxidation)	5,02	2	2184,67	0
1	L	IEFEGQSVDFVDPNK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	3	1	1	P07756		4,99	2	1724,08	0
1	L	EPLFGISTGNIITGLAAGAK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	4	1	1	P07756		4,87	2	1930,71	0
1	L	TVVVNcNPETVSTDFEcDK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	1	1	1	P07756	C6(Carbamidomethyl); C18(Carbamidomethyl)	4,83	2	2329,77	0
1	L	GLNSESVEETLR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	119	1	1	P07756		4,81	2	1434,53	0
1	L	FLGVAEQLHNEGFK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	30	1	1	P07756		4,79	2	1589,15	0
1	L	ALENNmSLDEIVK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	44	1	1	P07756	M6(Oxidation)	4,72	2	1492,03	0
1	L	ALENNMSLDEIVK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	52	1	1	P07756		4,65	2	1476,23	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
1	L	TVLmNPNIASVQTNEVGLK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	8	1	1	P07756	M4(Oxidation)	4,61	2	2044,62	0
1	L	TSAcFEPSLDYmVTK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	7	1	1	P07756	C4(Carbamidomethyl); M12(Oxidation)	4,39	2	1765,21	0
1	L	TSAcFEPSLDYMVTK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	25	1	1	P07756	C4(Carbamidomethyl)	4,33	2	1749,22	0
1	L	TLGVDFIDVATK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	74	1	1	P07756		4,25	2	1278,87	0
1	L	AQTAHIVLEDGTK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	51	1	1	P07756		4,22	2	1383,26	0
1	L	AFAISGFNVQFLVK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	2	1	1	P07756		4,21	2	1638,27	0
1	L	VLGTSVESImATEDR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	39	1	1	P07756	M10(Oxidation)	4,18	2	1624,15	0
1	L	AFAmTNQILVER	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	4	1	1	P07756	M4(Oxidation)	4,14	2	1410,10	0
1	L	GQNQPVLNITNR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	122	1	1	P07756		4,11	2	1354,14	0
1	L	IAPSFAVESmEDALK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	31	1	1	P07756	M10(Oxidation)	4,06	2	1625,25	0
1	L	GNDVLVIEcNLR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	33	1	1	P07756	C9(Carbamidomethyl)	3,96	2	1402,11	0
1	L	AADTIGYPVMIR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	43	1	1	P07756		3,88	2	1306,51	0
1	L	VSQEHPVVLTK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	60	1	1	P07756		3,88	2	1237,47	0
1	L	AADTIGYPVmlR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	36	1	1	P07756	M10(Oxidation)	3,82	2	1323,14	0
1	L	SVGEVMAIGR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	20	1	1	P07756		3,67	2	1019,04	0
1	L	IALGIPLPEIK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	51	1	1	P07756		3,66	2	1163,05	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
1	L	cLGLTEAQTR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	54	1	1	P07756	C1(Carbamidomethyl)	3,51	2	1148,93	0
1	L	McHPSVDGFTPR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	4	1	1	P07756	C2(Carbamidomethyl)	3,42	2	1404,06	0
1	L	SLGQWLQEEK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	3	1	1	P07756		3,37	2	1216,90	0
1	L	AFAMTNQILVER	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	2	1	1	P07756		3,32	2	1391,99	0
2	L	YNEVLTQccTESDK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	52	1	1	P02770	C8(Carbamidomethyl); C9(Carbamidomethyl)	5,21	2	1747,20	0
2	L	LGEYGFQNAVLVR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	51	1	1	P02770		4,76	2	1466,37	0
2	L	TcVADENAENcDK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	89	1	1	P02770	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl)	4,32	2	1525,30	0
2	L	LQAccDKPVLQK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	39	1	1	P02770	C4(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl)	4,10	2	1460,38	0
2	L	DVFLGTFLYEYSR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	7	1	1	P02770		4,08	2	1611,29	0
2	L	YmcENQATISSK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	16	1	1	P02770	M2(Oxidation); C3(Carbamidomethyl)	4,06	2	1448,04	0
2	L	APQVSTPTLVEAAR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	109	1	1	P02770		3,96	2	1441,88	0
2	L	FPNAEFAEITK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	97	1	1	P02770		3,94	2	1266,84	0
2	L	TVMGDFAQFVDK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	9	1	1	P02770		3,88	2	1357,91	0
2	L	YMcENQATISSK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	13	1	1	P02770	C3(Carbamidomethyl)	3,69	2	1432,29	0
2	L	EccHGDLLcADDRALAK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	1	1	1	P02770	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	3,68	2	2262,74	1

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
2	L	LPcVEDYLSAILNR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	1	1	1	P02770	C3(Carbamidomethyl)	3,65	2	1663,57	0
	L	LVQEVTDFAK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	74	1	1	P02770		3,56	2	1150,20	0
2	L	TVmGDFAQFVVK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	24	1	1	P02770	M3(Oxidation)	3,38	2	1374,12	0
2	L	GLVLIAFSQYLQK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	2	1	1	P02770		3,28	2	1481,20	0
2	L	LRDNYGELADccAK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	7	1	1	P02770	C11(Carbamidomethyl); C12(Carbamidomethyl)	3,26	2	1684,29	1
2	L	KQTALAELVK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	5	1	1	P02770		3,20	2	1102,23	1
2	L	ccSGSLVER	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	7	1	1	P02770	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl)	3,03	2	1067,49	0
2	L	ccTLPEAQR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	1	1	1	P02770	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl)	2,94	2	1135,46	0
2	L	AADKDNcFATEGPNLVAR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	102	1	1	P02770	C7(Carbamidomethyl)	5,27	3	1949,90	1
2	L	ccAEGDPPAcYGTVLAEFQPLVEEPK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	6	1	1	P02770	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	4,75	3	2938,70	0
2	L	EccHGDLLcADDR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	1	1	1	P02770	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	3,50	3	1750,56	0
3	L	LVQDVANNTNEEAGDGT TTATVLAR	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	103	1	1	P63039		6,14	2	2560,87	0
3	L	ISSVQSIVPALEIANAHR	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	41	2	1	P63039		5,78	2	1907,45	0
3	L	cEFQDAYVLLSEK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	19	3	1	P63039	C1(Carbamidomethyl)	5,15	2	1601,54	0
3	L	cIPALDSLKPANEDQK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	31	1	1	P63039	C1(Carbamidomethyl)	4,88	2	1799,20	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
3	L	TLNDELEIIEGMK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	32	2	1	P63039		4,80	2	1507,18	0
3	L	QSKPVTTPEEIAQVATISANGDK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	5	1	1	P63039		4,48	2	2385,98	0
3	L	GYISPYFINTSK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	18	2	1	P63039		4,03	2	1389,75	0
3	L	TVIIQSWGSPK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	27	2	1	P63039		4,00	2	1345,26	0
3	L	VGGTSDVEVNEK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	125	2	1	P63039		3,93	2	1235,32	0
3	L	VGLQVVAVK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	55	1	1	P63039		3,69	2	913,16	0
3	L	NAGVEGSLIVEK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	40	1	1	P63039		3,69	2	1215,47	0
3	L	VTDALNATR	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	138	2	1	P63039		3,49	2	961,62	0
3	L	AAVEEGIVLGGGcALLR	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	1	1	1	P63039	C13(Carbamido methyl)	3,31	2	1684,27	0
3	L	DIGNIISDAMK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	11	2	1	P63039		3,30	2	1177,23	0
3	L	DIGNIISDAmK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	13	2	1	P63039	M10(Oxidation)	3,29	2	1193,45	0
3	L	LSDGVAVLK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	8	1	1	P63039		3,19	2	903,65	0
3	L	ALMLQGVDLLADAVAVT MGPK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	2	1	1	P63039		4,52	3	2115,16	0
3	L	TALLDAAGVASLLTTAEA VVTEIPKEEK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	1	1	1	P63039		4,19	3	2841,10	1
3	L	TLNDELEIIEGmK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	41	2	1	P63039	M12(Oxidation)	4,16	3	1520,06	0
3	L	ALmLQGVDLLADAVAVT mGPK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	1	1	1	P63039	M3(Oxidation); M18(Oxidation)	4,07	3	2144,63	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
3	L	TALLDAAGVASLLTTAEA VVTEIPK	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_RAT]	1	1	1	P63039		3,63	3	2456,08	0
4	L	YQLDKDGVVLFK	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2 - [PDIA1_RAT]	50	1	1	P04785		4,53	2	1425,18	1
4	L	NFEEVAFDEKK	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2 - [PDIA1_RAT]	28	1	1	P04785		4,29	2	1357,90	1
4	L	mDSTANEVEAVK	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2 - [PDIA1_RAT]	28	1	1	P04785	M1(Oxidation)	4,06	2	1310,92	0
4	L	ITQFCHHFLEGG	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2 - [PDIA1_RAT]	4	1	1	P04785	C5(Carbamidomethyl)	3,98	2	1517,14	0
4	L	VDATEESDLAQYGVGR	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2 - [PDIA1_RAT]	177	1	1	P04785		6,41	3	1780,75	0
4	L	HNQLPLVIEFTEQTAPK	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2 - [PDIA1_RAT]	74	1	1	P04785		5,58	3	1965,02	0
4	L	LGETYKDHENIVIAK	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2 - [PDIA1_RAT]	115	1	1	P04785		5,50	3	1732,50	1
4	L	IKPHLmSQELPEDWDKQPVK	Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2 - [PDIA1_RAT]	1	1	1	P04785	M6(Oxidation)	4,02	3	2435,18	1
5	L	VAEQTPLTALYVANLIK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	67	2	1	P11884		6,10	2	1846,46	0
5	L	TFVQEDVYDEFVER	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	21	2	1	P11884		5,34	2	1775,46	0
5	L	ELGEYGLQAYTEVK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	43	2	1	P11884		4,96	2	1602,12	0
5	L	LGPALATGNVVVmK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	60	2	1	P11884	M13(Oxidation)	4,81	2	1386,30	0
5	L	TEQGPQVDETQFK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	101	2	1	P11884		4,80	2	1506,68	0
5	L	TFPTVNPSTGEVlcQVAEGNK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	7	2	1	P11884	C14(Carbamidomethyl)	4,80	2	2248,81	0
5	L	AAQAAFQLGSPWR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	33	1	1	P11884		4,65	2	1403,31	0
5	L	LGPALATGNVVVMK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	51	2	1	P11884		4,30	2	1371,34	0
5	L	GYFIQPTVFGDVK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	52	2	1	P11884		4,25	2	1471,09	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
5	L	EEIFGPVmqILK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	27	2	1	P11884	M8(Oxidation)	3,76	2	1420,15	0
5	L	YGLAAAVFTK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	15	2	1	P11884		3,69	2	1043,05	0
5	L	TFPTVNPSTGEVlcQVAEG NKEDVDK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	3	2	1	P11884	C14(Carbamido methyl)	3,67	2	2835,08	1
5	L	EEIFGPVmqILK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	32	2	1	P11884		3,41	2	1404,21	0
5	L	LLcGGGAAADR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	4	2	1	P11884	C3(Carbamidomethyl)	3,15	2	1061,07	0
5	L	VAFTGSTEVGHlIQVAAG SSNLK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	7	2	1	P11884		5,61	3	2287,12	0
5	L	EAGFPVPGVVNIvPGFGPTA GAAIASHEDVDK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	12	2	1	P11884		4,59	3	3023,01	0
5	L	ANYLSQALQAGTVWInCY DVFGAQSPPGGYK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	1	2	1	P11884	C17(Carbamido methyl)	4,13	3	3427,01	0
6	L	DLYANTVLSGGTTmYPGI ADR	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	21	3	1	P60711		6,31	2	2215,03	0
6	L	DLYANTVLSGGTTmYPGI ADR	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	12	3	1	P60711	M14(Oxidation)	5,66	2	2231,54	0
6	L	SYELPDGQVITIGNER	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	99	8	4	P62738; P60711; D3ZRN3; FILTQ2		5,09	2	1793,20	0
6	L	KDLYANTVLSGGTTmYPGI ADR	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	1	2	1	P60711	M15(Oxidation)	4,85	2	2359,29	1
6	L	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	156	2	1	P60711		3,88	2	1954,61	0
6	L	QEYDESGPSIVHR	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	22	2	1	P60711		3,39	2	1516,34	0
6	L	AGFAGDDAPR	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	22	6	2	P62738; P60711		3,37	2	977,65	0
6	L	GYSFTTTAER	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	15	2	1	P60711		3,36	2	1133,07	0
6	L	DSYVGDEAQS K	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	9	6	2	P62738; P60711		3,35	2	1199,13	0
6	L	EITALAPSTMK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	8	6	2	P62738; P60711		3,09	2	1163,08	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
6	L	HQGVMVGMGQK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	3	8	4	P62738; P60711 ;D3ZRN3; F1LTQ2		3,03	2	1171,32	0
6	L	EITALAPSTmK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	5	6	2	P62738 ;P60711	M10(Oxidation)	2,99	2	1178,09	0
6	L	LcYVALDFEQEMATAASS SSLEK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	1	2	1	P60711	C2(Carbamidomethyl)	3,38	3	2551,09	0
7	L	SVPMSTVFYPSDGVATEK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	36	2	1	P50137	M4(Oxidation)	4,34	2	1932,28	0
7	L	LGQSDPAPLQHQVDVYQK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	34	2	1	P50137		4,27	2	2024,48	0
7	L	SVPMSTVFYPSDGVATEK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	34	2	1	P50137		4,23	2	1915,49	0
7	L	LDNLVAIFDINR	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	8	2	1	P50137		4,15	2	1403,59	0
7	L	KISSDLDGHPVPK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	20	2	1	P50137		4,06	2	1393,13	1
7	L	mFGIDKDAIVQAVK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	1	2	1	P50137	M1(Oxidation)	3,79	2	1551,37	1
7	L	VLDPFITIKPLDK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	10	2	1	P50137		3,70	2	1385,42	0
7	L	ISSDLDGHPVPK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	44	2	1	P50137		3,66	2	1266,36	0
7	L	AVELAANTK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	50	2	1	P50137		3,03	2	916,86	0
7	L	IIALDGDTK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	37	2	1	P50137		2,72	2	945,60	0
7	L	HQPTAIIAK	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	13	2	1	P50137		2,70	2	979,19	0
7	L	LAVSQVPR	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	20	2	1	P50137		2,63	2	869,40	0
7	L	ILATPPQEDAPSVDIANIR	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	69	2	1	P50137		5,51	3	2021,58	0
8	L	NPANYFAEVEQMAFDPSN MPPGIEPSPDK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	21	1	1	P04762		7,02	3	3194,20	0
8	L	NPANYFAEVEQmAFDPSN mPPGIEPSPDK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	8	1	1	P04762	M12(Oxidation) M19(Oxidation)	6,79	3	3225,52	0
8	L	FYTEDGNWDLVGNNTPIF FIR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	38	1	1	P04762		6,43	3	2519,24	0
8	L	DLFNAIASGNYPSTWTFYIQ VMTFK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	3	1	1	P04762		5,92	3	2814,38	0
8	L	APQKPDVLTTGGGNPIGD K	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	60	1	1	P04762		5,64	2	1865,44	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
8	L	NAIHTYVQAGSHIAAK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	52	1	1	P04762		5,56	3	1681,44	0
8	L	DLFNAIASGNYPSTWTFYIQ VmTFK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	1	1	1	P04762	M21(Oxidation)	5,55	3	2829,18	0
8	L	FSTVAGESGSADTVR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	63	1	1	P04762		5,41	2	1483,59	0
8	L	GAGAFGYFEVTHDITR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	33	1	1	P04762		5,27	2	1741,27	0
8	L	VQALLDQYNSQKPK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	44	1	1	P04762		5,24	2	1632,40	0
8	L	GPLLVDVVFTEMAHFD R	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	23	1	1	P04762	M14(Oxidation)	5,12	3	2205,26	0
8	L	FNSANEDNVTQVR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	94	1	1	P04762		4,89	2	1496,07	0
8	L	GPLLVDVVFTEMAHFD R	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	26	1	1	P04762		4,89	3	2190,16	0
8	L	HMNGYGSHTFK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	11	1	1	P04762		4,79	3	1281,76	0
8	L	EAETFPFNPFDLTK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	78	1	1	P04762		4,37	2	1657,95	0
8	L	LGPNYLQIPVNCYR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	35	1	1	P04762	C12(Carbamidomethyl)	4,35	3	1805,33	0
8	L	LVNANGEAVYcK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	31	1	1	P04762	C11(Carbamidomethyl)	4,34	2	1338,15	0
8	L	NPANYFAVEQmAFDPSN MPPGIEPSPDK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	37	1	1	P04762	M12(Oxidation)	4,24	3	3209,34	0
8	L	NFTDVHPDYGAR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	27	1	1	P04762		4,04	2	1393,89	0
8	L	LcENIANHLK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	7	1	1	P04762	C2(Carbamidomethyl)	3,94	2	1211,44	0
8	L	LAQEDPDYGLR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	64	1	1	P04762		3,93	2	1276,95	0
8	L	DAQLFIQR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	57	1	1	P04762		3,66	2	990,80	0
8	L	DAmLFPSFIHSQK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	7	1	1	P04762	M3 (Oxidation)	3,49	2	1537,26	0
8	L	LNIMTAGPR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	28	1	1	P04762		3,46	2	973,60	0
8	L	DAMLFPSFIHSQK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	3	1	1	P04762		3,37	2	1520,63	0
9	L	ELNDFISYLQR	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2 - [PDIA3_RAT]	5	1	1	P11598		4,01	2	1398,27	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
9	L	mDATANDVPSPYEVK	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2 - [PDIA3_RAT]	1	1	1	P11598	M1 (Oxidation)	3,93	2	1652,68	0
9	L	GFPTIYFSPANK	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2 - [PDIA3_RAT]	10	1	1	P11598		3,48	2	1341,60	0
9	L	DLFSDGHSEFLK	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2 - [PDIA3_RAT]	1	1	1	P11598		3,29	2	1394,27	0
9	L	EATNPPIQEEKPK	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2 - [PDIA3_RAT]	3	1	1	P11598		3,12	2	1594,57	0
9	L	LSKDPNIVIAK	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2 - [PDIA3_RAT]	1	1	1	P11598		3,05	2	1197,19	1
9	L	MDATANDVPSPYEVK	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2 - [PDIA3_RAT]	1	1	1	P11598		3,02	2	1638,27	0
10	L	TQAALVLGSLEAR	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	25	1	1	O88618		5,34	2	1330,96	0
10	L	LGLDSLAPFDPK	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	25	1	1	O88618		4,15	2	1274,15	0
10	L	mGALDVcPFIPVR	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	6	1	1	O88618	M1(Oxidation); C7(Carbamidomethyl)	4,10	2	1491,22	0
10	L	ALLDAAAFYcDK	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	4	1	1	O88618	C10(Carbamidomethyl)	3,81	2	1357,40	0
10	L	GVSmDEcVLcAK	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	11	1	1	O88618	M4(Oxidation); C7(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	3,55	2	1385,25	0
10	L	GVSMDEcVLcAK	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	5	1	1	O88618	C7(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	3,48	2	1368,99	0
10	L	MGALDVcPFIPVR	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	2	1	1	O88618	C7(Carbamidomethyl)	3,08	2	1475,58	0
10	L	LFVLEEEHR	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	1	1	1	O88618		2,96	2	1173,13	0
10	L	TASQLIDmR	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	2	1	1	O88618	M8(Oxidation)	2,91	2	1050,71	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
10	L	AGEYEALPEK	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	1	1	1	O88618		2,87	2	1107,15	0
10	L	TcALQEGLR	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	1	1	1	O88618	C2(Carbamidomethyl)	2,82	2	1047,79	0
10	L	LAEELNVPVYLYGEAAQmPSR	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase OS=Rattus norvegicus GN=Ftcd PE=1 SV=4 - [FTCD_RAT]	1	1	1	O88618	M18(Oxidation)	2,77	3	2365,23	0
11	L	VYEGSILEADcDILIPAASEK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	46	1	1	P10860	C11(Carbamidomethyl)	7,12	3	2293,76	0
11	L	cVGVGESDGSIWNPdGIDPK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	18	1	1	P10860	C1(Carbamidomethyl)	5,81	2	2101,86	0
11	L	KGFIGPGIDVPAPDMSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	8	1	1	P10860		5,57	2	2046,24	1
11	L	GFIGPGIDVPAPDMSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	36	1	1	P10860	M14(Oxidation)	5,54	2	1932,50	0
11	L	GFIGPGIDVPAPDMSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	21	1	1	P10860		5,47	2	1918,16	0
11	L	KGFIGPGIDVPAPDMSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	6	1	1	P10860	M15(Oxidation)	4,98	2	2061,21	1
11	L	IIAEGANGPTTPEADK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	27	1	1	P10860		4,94	2	1585,48	0
11	L	HGGTIPVVPTAEFQDR	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	44	1	1	P10860		4,50	2	1726,17	0
11	L	IIAEGANGPTTPEADKIFLER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	19	1	1	P10860		4,31	2	2244,60	1
11	L	GASIVEDKLVEDLK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	3	1	1	P10860		4,13	2	1517,30	1
11	L	DDGSWEVIEGYR	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	3	1	1	P10860		4,04	2	1426,00	0
11	L	DIVHSGLAYTMER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	11	2	1	P10860		3,83	2	1492,20	0
11	L	DIVHSGLAYTmER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	13	2	1	P10860	M11(Oxidation)	3,78	2	1508,17	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
11	L	LQHGSILGFPK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	8	1	1	P10860		3,48	2	1196,94	0
11	L	TAAYVNAIEK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	18	2	1	P10860		3,43	2	1081,38	0
11	L	cAVVDVPFGGAK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	1	1	1	P10860	C1(Carbamidomethyl)	3,39	2	1219,23	0
11	L	YNLGLDLR	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	9	2	1	P10860		3,25	2	965,69	0
11	L	YSTDVSDEVK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	15	1	1	P10860		3,24	2	1241,88	0
12	L	LMFNDFLSSSSDK	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	32	2	1	P22791		4,96	2	1491,14	0
12	L	LmFNDFLSSSSDK	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	47	2	1	P22791	M2(Oxidation)	4,94	2	1506,51	0
12	L	MSPEEFTEIMNQR	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	18	2	1	P22791		4,51	2	1612,19	0
12	L	mSPEEFTEImNQR	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	12	2	1	P22791	M1(Oxidation); M10(Oxidation)	4,41	2	1644,44	0
12	L	APLVLEQGLR	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	60	2	1	P22791		4,18	2	1098,15	0
12	L	LEETYTNKDVDK	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	4	2	1	P22791		4,08	2	1455,07	1
12	L	MSPEEFTEImNQR	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	29	2	1	P22791	M10(Oxidation)	3,99	2	1628,42	0
12	L	LVSSVSDLPK	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	6	2	1	P22791		3,26	2	1044,99	0
12	L	YTVGLGQTR	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	2	2	1	P22791		3,20	2	995,88	0
12	L	QVADEGDALVAGGVSQTP SYLScK	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	13	1	1	O09171	C23(Carbamidomethyl)	5,40	2	2452,00	0
12	L	AGPWTPEAAVEHPEAVR	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	10	1	1	O09171		4,81	2	1817,37	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
12	L	AGAAIVGVNcHFDPSLSQTIK	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	1	1	1	O09171	C10(Carbamidomethyl)	3,53	2	2286,96	0
12	L	VNEAAcDIAR	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	1	1	1	O09171	C6(Carbamidomethyl)	3,18	2	1119,18	0
12	L	AIAEELAPER	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	2	3	1	O09171		3,16	2	1099,13	0
12	L	TSGKPAAATmcIGPEGDLHGVSPGEcAVR	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	1	1	1	O09171	M10(Oxidation); C11(Carbamidomethyl); C26(Carbamidomethyl)	3,94	3	2984,77	0
13	L	LcGSGFGQIVSGcQEicSK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	15	2	2	P13437; G3V9U2	C2(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl); C17(Carbamidomethyl)	6,19	2	2117,18	0
13	L	TNVSGGAIALGHPLGGSGSR	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	46	2	2	P13437; G3V9U2		6,02	2	1808,37	0
13	L	EGTVTAGNASGMSDGAGVVIIASEDAVK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	9	2	2	P13437; G3V9U2		5,90	2	2606,67	0
13	L	AANEAGYFNEEMAPIEVK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	27	2	2	P13437; G3V9U2		5,67	2	1982,69	0
13	L	AANEAGYFNEEMAPIEVK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	33	2	2	P13437; G3V9U2	M12(Oxidation)	5,55	2	2000,26	0
13	L	DFTATDLTEFAAR	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	60	2	2	P13437; G3V9U2		5,35	2	1457,68	0
13	L	LEDTLWAGLTDQHVK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	12	2	2	P13437; G3V9U2		4,89	2	1725,69	0
13	L	LPMGMTAENLAAK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	11	2	2	P13437; G3V9U2		4,20	2	1346,67	0
13	L	QTMQVDEHARPQTTLQLQK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	2	1	1	G3V9U2		4,18	2	2381,25	0
13	L	VGVPTEGTGALTNR	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	82	2	2	P13437; G3V9U2		3,97	2	1429,31	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
13	L	LPmGmTAENLAAK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	17	2	2	P13437; G3V9U2	M3(Oxidation); M5(Oxidation)	3,48	2	1378,12	0
13	L	TPFGAYGGLLK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	17	2	2	P13437; G3V9U2		3,32	2	1125,72	0
13	L	DMDLIDVNEAFAPQFLAV QK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	1	2	2	P13437;G3 V9U2		3,18	2	2265,38	0
13	L	LPmGMTAENLAAK	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=3 SV=2 - [G3V9U2_RAT]	13	2	2	P13437; G3V9U2	M3(Oxidation)	2,89	2	1362,10	0
13	L	TSGKPAAATMcIGPEGDLH GVSPGEcAVR	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	4	1	1	O09171	C11(Carbamidomethyl); C26(Carbamidomethyl)	6,96	3	2967,70	0
13	L	AGAAIVGVNcHFDPTSLQ TIK	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	29	1	1	O09171	C10(Carbamidomethyl)	6,42	2	2286,57	0
13	L	QVADEGDALVAGGVSTP SYLSck	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	44	1	1	O09171	C23(Carbamidomethyl)	6,21	3	2451,35	0
13	L	TSGKPAAATMcIGPEGDLH GVSPGEcAVR	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	5	1	1	O09171	M10(Oxidation); C11(Carbamidomethyl); C26(Carbamidomethyl)	6,19	3	2982,21	0
13	L	AGPWTPAAVEHPEAVR	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	44	1	1	O09171		5,36	2	1817,17	0
13	L	QGFIDLPEFPFGLEPR	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	14	1	1	O09171		4,72	2	1862,48	0
13	L	AGSNVMQTFTFYASEDK	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	7	1	1	O09171		4,57	2	1897,11	0
13	L	LNAGEVVIGDGGVFVALE K	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	7	1	1	O09171		4,47	3	1935,84	0
13	L	VNEAAcDIAR	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	39	1	1	O09171	C6(Carbamidomethyl)	3,42	2	1119,04	0
13	L	AIAEELAPER	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	57	3	1	O09171		3,42	2	1099,86	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
13	L	GAAELMQQK	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	7	1	1	O09171		3,07	2	976,99	0
13	L	IFHQQLVFMK	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	2	1	1	O09171	M10(Oxidation)	3,06	2	1436,87	0
13	L	AYLmSHALAYHTPDcGK	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	3	1	1	O09171	M4(Oxidation); C15(Carbamidomethyl)	3,04	2	1952,30	0
13	L	GAAELmQQK	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt PE=1 SV=1 - [BHMT1_RAT]	3	1	1	O09171	M6(Oxidation)	3,03	2	991,29	0
13	L	LMFNDFLSSSSDK	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	48	2	1	P22791		5,16	2	1493,26	0
13	L	LmFNDFLSSSSDK	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	21	2	1	P22791	M2(Oxidation)	4,88	2	1506,82	0
13	L	MSPEEFTEIMNQR	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	15	2	1	P22791		4,87	2	1612,20	0
13	L	APLVLEQGLR	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	40	2	1	P22791		4,08	2	1098,33	0
13	L	mSPEEFTEIMNQR	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	6	2	1	P22791	M1(Oxidation)	3,51	2	1627,91	0
13	L	mSPEEFTEImNQR	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	1	2	1	P22791	M1(Oxidation); M10(Oxidation)	3,32	2	1644,66	0
13	L	LEETYTNKDVDK	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	1	2	1	P22791		2,97	2	1455,21	1
13	L	LVSSVSDLPK	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	1	2	1	P22791		2,94	2	1045,55	0
14	L	TcGFDFSGALEDISK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	29	2	1	P00507	C2(Carbamidomethyl)	5,33	2	1646,68	0
14	L	FVTVQTISGTGALR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	55	1	1	P00507		5,06	2	1450,74	0
14	L	IAATILTSPDLR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	81	2	1	P00507		4,75	2	1270,71	0
14	L	ASAEALALGENSEVLK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	77	1	1	P00507		4,59	2	1532,64	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
14	L	EYLPIGGLADFcK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	23	1	1	P00507	C12(Carbamidomethyl)	3,92	2	1483,17	0
14	L	DAGMQLQGYR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	10	3	1	P00507		3,75	2	1138,95	0
14	L	DAGmQLQGYR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	17	3	1	P00507	M4(Oxidation)	3,52	2	1155,00	0
14	L	VGAFTVVcK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	26	1	1	P00507	C8(Carbamidomethyl)	3,24	2	980,93	0
14	L	VGASFLQR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	28	3	1	P00507		3,23	2	877,89	0
14	L	DDNGKPYVLPsvR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	1	1	1	P00507		3,20	2	1460,44	0
14	L	KAEAQIAGK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	3	1	1	P00507		3,01	2	915,48	1
14	L	NLDKEYLPIGGLADFcK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	2	1	1	P00507	C16(Carbamidomethyl)	4,15	3	1954,14	1
15	L	VTPGSTcAVFGLGGVGLSV VIGcK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	14	2	1	P06757	C7(Carbamidomethyl); C23(Carbamidomethyl)	6,11	2	2335,75	0
15	L	FPLEPLITHVLPFEK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	10	2	1	P06757		4,60	2	1782,11	0
15	L	INEAFDLLR	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	144	2	1	P06757		3,76	2	1091,00	0
15	L	IDAAAPLDK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	20	2	1	P06757		3,21	2	914,94	0
15	L	IIAVDINKDK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	4	2	1	P06757		3,12	2	1130,67	1
15	L	HPESNLccQTK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	11	2	1	P06757	C7(Carbamidomethyl); C8(Carbamidomethyl)	3,12	2	1373,51	0
15	L	SDDHAVSGSLFTPLPAVLG HEGAGIVESIGEGVTcVKP GDK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	9	1	1	P06757	C35(Carbamidomethyl)	7,19	3	4103,65	0
15	L	VcLIGcGFSTGYGSAVQVA K	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	66	2	1	P06757	C2(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl)	6,88	3	2074,01	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
15	L	AAVLWEPHKPFTIEDIEVAPPK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	106	2	1	P06757		6,23	3	2490,66	0
15	L	GKPIHHFISTSTFSQYTVVD DIAVAK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	1	2	1	P06757		5,74	3	2864,06	0
15	L	KFPLEPLITHVLPFEK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	49	2	1	P06757		4,35	3	1908,01	1
15	L	IDAAAPLDKVCcLIGcGFSTGYGSAVQVAK	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	1	2	1	P06757	C11(Carbamidomethyl); C15(Carbamidomethyl)	3,67	3	2969,27	1
16	L	SPVLLDDPVLcAIAK	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c9 PE=1 SV=1 - [DIDH_RAT]	30	1	1	P23457	C11(Carbamidomethyl)	5,17	2	1611,21	0
16	L	YFDDHPNHPFTDE	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c9 PE=1 SV=1 - [DIDH_RAT]	20	1	1	P23457		4,19	2	1634,22	0
16	L	SIGVSNFNcR	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c9 PE=1 SV=1 - [DIDH_RAT]	52	1	1	P23457	C9(Carbamidomethyl)	3,68	2	1153,96	0
16	L	IAIDNGFR	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c9 PE=1 SV=1 - [DIDH_RAT]	2	1	1	P23457		3,03	2	906,01	0
16	L	ILNKPLGK	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c9 PE=1 SV=1 - [DIDH_RAT]	1	18	1	P23457		2,98	2	882,93	0
16	L	VAKDEVIK	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c9 PE=1 SV=1 - [DIDH_RAT]	1	1	1	P23457		2,95	2	902,89	1
16	L	YKPVcNQVEcHLYLNQSK	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c9 PE=1 SV=1 - [DIDH_RAT]	3	4	1	P23457	C5(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	3,73	3	2280,96	0
17	L	AQFGQPEILLGTIPGAGGTQR	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1 - [ECHM_RAT]	104	1	1	P14604		5,96	2	2113,47	0
17	L	SLAmEmVLTGDR	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1 - [ECHM_RAT]	42	1	1	P14604	M4(Oxidation); M6(Oxidation)	4,31	2	1355,26	0
17	L	ESVNAAFEmTLTEGNK	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1 - [ECHM_RAT]	11	1	1	P14604	M9(Oxidation)	4,31	2	1757,40	0
17	L	NSSVGLIQLNRPK	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1 - [ECHM_RAT]	82	1	1	P14604		4,09	2	1426,53	0
17	L	LFYSTFATDDR	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1 - [ECHM_RAT]	8	1	1	P14604		3,58	2	1336,49	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
17	L	SLAmEMVLTGDR	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1 - [ECHM_RAT]	26	1	1	P14604	M4(Oxidation)	3,31	2	1339,10	0
17	L	KLFYSTFATDDR	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1 - [ECHM_RAT]	4	1	1	P14604		3,03	2	1465,24	1
18	L	ASQPPSSSTQVTAIQcNIR	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	13	1	1	Q9WVK3	C16(Carbamidomethyl)	4,54	2	2045,69	0
18	L	TMALTWASSGVR	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	6	1	1	Q9WVK3		3,58	2	1280,11	0
18	L	KEEEVNNLVK	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	7	1	1	Q9WVK3		3,33	2	1203,21	1
18	L	TmALTWASSGVR	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	3	1	1	Q9WVK3	M2(Oxidation)	3,14	2	1295,81	0
18	L	LTAADVDEL	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	3	1	1	Q9WVK3		3,00	2	987,96	0
18	L	INFLVNNAGGQFmAPAEDITAK	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	8	1	1	Q9WVK3	M13(Oxidation)	4,98	3	2337,83	0
19	M	VIPAADLSEQISTAGTEASGTGNmK	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	135	2	1	G3V8V3	M24(Oxidation)	5,23	3	2464,94	0
19	M	WLVLcNPGLAEVIAER	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	3	2	1	G3V8V3	C5(Carbamidomethyl)	5,16	2	1840,89	0
19	M	QIIEQLSSGFFSPK	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	231	2	1	G3V8V3		4,53	3	1583,08	0
19	M	TcAYTNHTVLPEALER	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	165	4	2	P53534; G3V8V3	C2(Carbamidomethyl)	4,44	2	1874,08	0
19	M	WVDTQVVLAmPYDTPVP GYR	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	5	2	1	G3V8V3	M10(Oxidation)	4,43	3	2324,57	0
19	M	LITAIGDVVNHDPAVGDR	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	61	2	1	G3V8V3		4,30	2	1863,80	0
19	M	IGEEYISDLQRL	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	43	2	1	G3V8V3		4,01	2	1550,68	0
19	M	IcGGWQmEEADDWLR	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	3	2	1	G3V8V3	C2(Carbamidomethyl); M7(Oxidation)	3,82	2	1881,70	0
19	M	VHINPNSLFDVQVK	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	20	2	1	G3V8V3		3,77	2	1610,78	0
19	M	INmAHLcIAGSHAVNGVAR	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	1	2	1	G3V8V3	M3(Oxidation); C7(Carbamidomethyl)	3,73	3	2007,72	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
19	M	IGEEYISDLQLRK	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	8	2	1	G3V8V3		3,42	3	1680,47	1
19	M	DYYFALAHTVR	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	1	3	1	G3V8V3		3,41	2	1355,54	0
19	M	VAIQLNDTHPSLAIPeLmR	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	76	1	1	G3V8V3	M18(Oxidation)	3,38	3	2134,73	0
19	M	GYNAQEYYDR	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	2	2	1	G3V8V3		3,32	2	1278,85	0
19	M	GLAGVENVSDLKK	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	21	2	1	G3V8V3		3,25	2	1329,74	1
19	M	VAIQLNDTHPSLAIPeLMR	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	15	1	1	G3V8V3		3,10	3	2117,74	0
19	M	VFADYEEYIK	Phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=3 SV=1 - [G3V8V3_RAT]	16	2	1	G3V8V3		3,07	2	1275,82	0
20	M	RPcFSALTVDETYVPK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	11	1	1	P02770	C3(Carbamidomethyl)	4,60	3	1881,77	0
20	M	ccAEGDPPAcYGTVLAEFQPLVEEPK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	3	1	1	P02770	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	4,46	3	2937,04	0
20	M	AADKDNcFATEGPNLVAR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	41	1	1	P02770	C7(Carbamidomethyl)	4,29	3	1950,27	1
20	M	YNEVLTQccTESDK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	17	1	1	P02770	C8(Carbamidomethyl); C9(Carbamidomethyl)	4,10	2	1746,66	0
20	M	TcVADENAENcDK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	5	1	1	P02770	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl)	3,57	2	1525,59	0
20	M	FPNAEFAEITK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	266	1	1	P02770		3,52	2	1266,67	0
20	M	LQAccDKPVLQK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	33	1	1	P02770	C4(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl)	3,41	2	1460,62	0
20	M	LGEYGFQNAVLVR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	62	1	1	P02770		3,39	2	1466,73	0
20	M	TVmGDFAQFVDK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	85	1	1	P02770	M3(Oxidation)	3,24	2	1373,49	0
20	M	TVMGDFAQFVDK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	22	1	1	P02770		3,22	2	1359,49	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
20	M	YmcENQATISSK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	6	1	1	P02770	M2(Oxidation); C3(Carbamidomethyl)	2,98	2	1446,78	0
20	M	APQVSTPTLVEAAR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	29	1	1	P02770		2,94	2	1439,04	0
20	M	LVQEVTDFAK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	24	1	1	P02770		2,93	2	1149,55	0
20	M	FKDLGEQHFK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	1	1	1	P02770		2,72	2	1248,65	1
21	M	ADNFEYSDPVDGSISK	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	57	2	1	Q499Q4		4,16	2	1744,67	0
21	M	TIEEYAlcPDLK	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	114	2	1	Q499Q4	C8(Carbamidomethyl)	4,12	2	1450,90	0
21	M	YDYEEVEAEGANK	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	39	2	1	Q499Q4		3,96	2	1516,65	0
21	M	FNISNGGPAPEAITDK	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	211	2	1	Q499Q4		3,88	2	1631,82	0
21	M	QEATLVVGGDGR	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	211	2	1	Q499Q4		3,59	2	1201,51	0
21	M	LSGTGSAGATIR	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	204	2	1	Q499Q4		3,41	2	1090,58	0
21	M	TQAYPDQKPGTSGLR	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	28	2	1	Q499Q4		2,99	2	1619,73	0
21	M	IAlYETPTGWK	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	40	1	1	Q499Q4		2,77	2	1278,73	0
21	M	DLEALmLDR	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	18	2	1	Q499Q4	M6(Oxidation)	2,63	2	1091,51	0
21	M	VDLSVLGK	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	5	1	1	Q499Q4		2,54	2	829,76	0
21	M	AIGGIILTASHNPGGPNGD FGIK	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	61	2	1	Q499Q4		5,30	3	2206,10	0
21	M	HGFFVNPSDSVAVIAANIF SIPYFQQTGVR	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	1	2	1	Q499Q4		4,10	3	3282,55	0
21	M	LVIGQNILSTPAVScIIR	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	10	2	1	Q499Q4	C16(Carbamidomethyl)	3,88	3	2010,94	0
21	M	VFQGNANYAENFIQSIYST VEPALR	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	2	2	1	Q499Q4		3,55	3	2768,28	0
21	M	SGEHDFGAAFDGDGDR	Phosphoglucomutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgm1 PE=2 SV=2 - [Q499Q4_RAT]	34	2	1	Q499Q4		3,40	3	1653,57	0
22	M	GADYLVTEVENGGSLGSK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	143	4	1	P11980		4,94	2	1796,69	0
22	M	AATESFASDPILYRPVAVA LDTK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	9	3	1	P11980		4,75	2	2435,06	0
22	M	DAVLDAWAEDVDLR	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	49	4	1	P11980		4,48	2	1588,71	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
22	M	KGVNLPGAAVDLPVSEK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	32	4	1	P11980		4,39	2	1766,70	1
22	M	GVNLPGAAVDLPVSEK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	255	4	1	P11980		4,26	2	1635,88	0
22	M	cDENILWLDYK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	70	4	1	P11980	C1(Carbamidomethyl)	4,12	2	1468,56	0
22	M	IYVDDGLISLQVK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	49	4	1	P11980		3,94	2	1462,77	0
22	M	NTGIcTIGPASR	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	234	4	1	P11980	C6(Carbamidomethyl)	3,50	2	1359,66	0
22	M	LNFSHGTHEYHAETIK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	7	5	1	P11980		3,47	2	1883,83	0
22	M	GDLGIEIPA EK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	22	5	1	P11980		3,31	2	1141,71	0
22	M	LDIDSAPITAR	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	90	5	1	P11980		3,22	2	1173,59	0
22	M	cLAAALIVLTESGR	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	1	1	1	P11980	C1(Carbamidomethyl)	3,21	2	1473,79	0
22	M	GSQTAEVELKK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	17	5	1	P11980		3,18	2	1120,39	1
22	M	EAEAAVFHR	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	20	1	1	P11980		2,90	2	1029,78	0
22	M	GSQTAEVELK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	5	5	1	P11980		2,88	2	990,51	0
22	M	ITLDNAYmEK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	2	6	1	P11980	M8(Oxidation)	2,77	2	1212,94	0
22	M	LLFEELAR	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	1	1	1	P11980		2,71	2	990,52	0
22	M	AEGSDVANAVLDGADcImLSGETAK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	36	3	1	P11980	C16(Carbamidomethyl); M18(Oxidation)	6,73	3	2510,22	0
22	M	ASSQSTDPLEAmAmGSVEASYK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	34	1	1	P11980	M12(Oxidation); M14(Oxidation)	6,25	3	2291,29	0
22	M	AEGSDVANAVLDGADcImLSGETAK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	7	3	1	P11980	C16(Carbamidomethyl)	5,37	3	2494,04	0
22	M	ASSQSTDPLEAMAmGSVEASYK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	2	1	1	P11980	M14(Oxidation)	5,02	3	2277,40	0
22	M	KGVNLPGAAVDLPVSEKDIQDLK	Pyruvate kinase PKM OS=Rattus norvegicus GN=Pkm PE=1 SV=3 - [KPYM_RAT]	1	4	1	P11980		4,76	3	2477,75	2
23	M	LAmQEfmLPVGASSFK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	184	1	1	P15429	M3(Oxidation); M7(Oxidation)	5,23	2	1901,19	0
23	M	AAVPSGASTGIYEALRLR	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	74	6	3	M0R5J4; P15429; M0RAU4		3,97	2	1805,87	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
23	M	LAMQEFMILPVGASSFK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	2	1	1	P15429		3,75	2	1869,79	0
23	M	TAIQAAGYPDK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	189	1	1	P15429		3,44	2	1136,85	0
23	M	GNPTVEVDLHTAK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	173	2	1	P15429		3,43	2	1380,70	0
23	M	FmIELDGTENK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	56	1	1	P15429	M2(Oxidation)	3,24	2	1312,63	0
23	M	KAcNcLLLK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	1	1	1	P15429	C3(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl)	3,01	2	1120,66	1
23	M	DATNVGDEGGFAPNILEN NEALELLK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	97	1	1	P15429		2,98	2	2744,20	0
23	M	LAQSNQWGVmVSHR	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	5	6	3	M0R5J4; P15429; M0RAU4	M10(Oxidation)	2,96	2	1557,85	0
23	M	LAQSNQWGVmVSHR	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	2	6	3	M0R5J4; P15429; M0RAU4		2,87	2	1542,83	0
23	M	AcNcLLLK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	4	2	1	P15429	C2(Carbamidomethyl); C4(Carbamidomethyl)	2,77	2	991,49	0
23	M	IEEALGDK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	1	1	1	P15429		2,71	2	873,95	0
23	M	IGAEVYHHLK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	1	1	1	P15429		2,71	2	1165,98	0
23	M	VNQIGSVTESIQAcK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	281	5	3	P15429; M0R5J4; M0RAU4	C14(Carbamidomethyl)	5,61	3	1633,25	0
23	M	SGETEDTFIADLVVGLcTG QIK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	8	5	3	M0R5J4; P15429; M0RAU4	C17(Carbamidomethyl)	5,13	3	2354,25	0
23	M	HIADLAGNPDLVLPVPAF NVINGGSHAGNK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	1	1	1	P15429		5,01	3	3009,10	0
23	M	VVIGmDVAASEFYR	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	69	1	1	P15429	M5(Oxidation)	4,05	3	1573,01	0
23	M	LAmQEFMILPVGASSFK	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	154	1	1	P15429	M3(Oxidation)	4,04	3	1885,37	0
24	M	GTGGVDTAAGVAVFDISN ADR	Creatine kinase M-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckm PE=1 SV=2 - [KCRM_RAT]	136	1	1	P00564		6,00	2	1993,55	0
24	M	LGSSEVEQVQLVVDGVK	Creatine kinase M-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckm PE=1 SV=2 - [KCRM_RAT]	92	1	1	P00564		5,58	2	1788,38	0
24	M	LSVEALNSLTGEFK	Creatine kinase M-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckm PE=1 SV=2 - [KCRM_RAT]	51	1	1	P00564		5,48	2	1508,31	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
24	M	GGDDLDPNYVLSSR	Creatine kinase M-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckm PE=1 SV=2 - [KCRM_RAT]	147	1	1	P00564		4,85	2	1510,19	0
24	M	GQSIDDMIPAQK	Creatine kinase M-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckm PE=1 SV=2 - [KCRM_RAT]	4	1	1	P00564		3,96	2	1302,67	0
24	M	RGTGGVDTAAGVAFDIS NADR	Creatine kinase M-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckm PE=1 SV=2 - [KCRM_RAT]	16	1	1	P00564		5,12	3	2150,11	1
25	M	FSNEEIamATVTALR	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	18	1	1	P05065	M8(Oxidation)	3,93	2	1670,23	0
25	M	LQSIGTENTEENR	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	67	2	1	P05065		3,52	2	1490,01	0
25	M	ALANSLacQGK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	248	2	1	P05065	C8(Carbamidomethyl)	3,47	2	1131,85	0
25	M	GILAADESTGSIK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	372	2	1	P05065		3,41	2	1331,74	0
25	M	AAQEEYIK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	40	2	1	P05065		2,98	2	951,55	0
25	M	AAQEEYIKR	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	3	2	1	P05065		2,77	2	1108,54	1
25	M	cQYVTEK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	1	3	1	P05065	C1(Carbamidomethyl)	2,68	2	928,69	0
25	M	YASlcQQNGIVPIVEPEILP DGDHDLK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	11	3	1	P05065	C5(Carbamidomethyl)	5,24	3	3020,00	0
25	M	GVVPLAGTNGETTTQGLD GLSER	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	500	1	1	P05065		5,13	3	2272,96	0
25	M	ADDGRFPQVIK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	3	1	1	P05065		3,07	3	1344,84	0
26	M	GILAADESTGSIK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	348	2	1	P05065		4,12	2	1332,21	0
26	M	LQSIGTENTEENR	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	73	2	1	P05065		3,48	2	1490,66	0
26	M	ALANSLacQGK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	195	2	1	P05065	C8(Carbamidomethyl)	3,36	2	1132,97	0
26	M	AAQEEYIK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	40	2	1	P05065		3,22	2	953,51	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
26	M	VLAADVYK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	1	5	1	P05065		2,79	2	763,41	0
26	M	YASlcQQNGIVPIVEPEILP DGDHDLK	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	80	3	1	P05065	C5(Carbamidomethyl)	6,26	3	3020,35	0
26	M	YTPSGQSGAAASESLFISN HAY	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	76	1	1	P05065		5,57	3	2257,26	0
26	M	IGEHTPSSLAImENANVLA R	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	17	1	1	P05065	M12(Oxidation)	5,44	3	2139,40	0
26	M	FSNEEIAMATVTALR	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	74	1	1	P05065		5,06	3	1654,05	0
26	M	GVVPLAGTNGETTTTQGLD GLSER	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	525	1	1	P05065		4,94	3	2272,51	0
26	M	FSNEEIAmATVTALR	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	145	1	1	P05065	M8(Oxidation)	4,63	3	1668,25	0
27	M	WGDAGAERYVVESTGVFT TMEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	93	4	1	P04797		6,87	2	2277,50	0
27	M	WGDAGAERYVVESTGVFT TmEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	59	4	1	P04797	M19(Oxidation)	6,73	2	2293,39	0
27	M	IVSNAScTTNcLAPLAK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	90	15	3	P04797; E9PTN6; M0R660	C7(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl)	5,55	2	1820,45	0
27	M	VIISAPSADAPMFVMGVN HEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	4	7	2	P04797; M0R660		5,12	2	2213,47	0
27	M	LISWYDNEYGYSNR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	32	15	4	P04797; D3Z8U8; E9PTN6; M0R660		5,12	2	1779,95	0
27	M	VIISAPSADAPMFVmGVN HEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	18	7	2	P04797; M0R660	M15(Oxidation)	4,60	2	2229,50	0
27	M	VPTPNVSVVDLTcR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	89	7	3	P04797; E9PTN6; M0R660	C13(Carbamidomethyl)	4,46	2	1557,18	0
27	M	GAAQNIIPASTGAAK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	197	8	2	P04797; M0R660		4,34	2	1372,09	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
27	M	VVDLMAYMASK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	30	21	3	P04797; E9PTN6; M0R660		4,17	2	1228,06	0
27	M	VVDLMAYMASKE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	5	15	3	P04797; E9PTN6; M0R660		3,78	2	1357,14	1
27	M	VVDLmAYmASK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	8	21	3	P04797; E9PTN6; M0R660	M5(Oxidation); M8(Oxidation)	3,74	2	1261,01	0
27	M	VVDLMAYmASK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	26	21	3	P04797; E9PTN6; M0R660	M8(Oxidation)	3,60	2	1244,95	0
27	M	LVINGKPITIFQER	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	5	14	1	P04797		3,42	2	1629,20	0
27	M	VIHDNFGIVEGLMTTVHAITAT QK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	21	6	2	P04797; M0R660		6,93	3	2598,15	0
27	M	RVIISAPSADAPMFVMGVNHE K	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	12	7	2	P04797; M0R660		6,88	3	2369,71	1
27	M	VIHDNFGIVEGLmTTVHAITAT QK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	20	6	2	P04797; M0R660	M13(Oxidation)	6,41	3	2612,60	0
27	M	DPANIKWGDAGAEYVVESTG VFTTMEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	2	4	1	P04797		5,98	3	2916,50	1
27	M	RVIISAPSADAPMFVmGVNHE K	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	8	7	2	P04797; M0R660	M16(Oxidation)	4,86	3	2385,19	1
28	M	WGDAGAEYVVESTGVFTTME K	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	108	4	2	P04797; M0RA22		5,62	2	2276,88	0
28	M	VIISAPSADAPmFVmGVNHEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	4	7	2	P04797; M0R660	M12(Oxidation); M15(Oxidation)	4,05	2	2246,03	0
28	M	VIISAPSADAPMFVMGVNHEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	39	7	2	P04797; M0R660		3,89	2	2213,04	0
28	M	LISWYDNEYGYSNR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	36	15	7	P04797; D3Z8U8; E9PTN6; D4A3W5; F1M4G6; M0R660; F1M9J9		3,83	2	1779,59	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
28	M	GAAQNIIPASTGAAK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	528	8	2	P04797; M0R660		3,80	2	1371,59	0
28	M	VPTPNVSVVDLTcR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	142	7	3	P04797; E9PTN6; M0R660	C13(Carbamidomethyl)	3,50	2	1556,50	0
28	M	VVDLMAYMASK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	126	21	5	P04797; E9PTN6; D4A3W5; M0R660; F1M9J9		3,40	2	1227,61	0
28	M	VVDLmAYmASK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	294	21	5	P04797; E9PTN6; D4A3W5; M0R660; F1M9J9	M5(Oxidation); M8(Oxidation)	3,38	2	1259,53	0
28	M	VVDLMAYMASKE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	11	15	4	P04797; E9PTN6; D4A3W5; M0R660		3,21	2	1356,65	1
28	M	VIISAPSADAPmFVMGVNHEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	10	7	2	P04797; M0R660	M12(Oxidation)	3,02	2	2228,88	0
28	M	VVDLmAYMASK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	146	21	5	P04797; E9PTN6; D4A3W5; M0R660; F1M9J9	M5(Oxidation)	2,99	2	1243,43	0
28	M	VVDLmAYMASKE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	8	15	4	P04797; E9PTN6; D4A3W5; M0R660	M5(Oxidation)	2,85	2	1372,36	1
28	M	VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	16	6	2	P04797; M0R660		7,18	3	2595,42	0
28	M	GILGYTEDQVVSdDFNSNSHSS TFDAGAGIALNDNFVK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	69	6	3	P04797; F1M269; M0R660	C13(Carbamidomethyl)	6,19	3	4050,75	0
28	M	VDIVAINDPFIDLNYMVYMFQ YDSTHGK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	29	5	2	P04797; E9PTN6		6,05	3	3308,95	0
28	M	VDIVAINDPFIDLNYMVYmFQ YDSTHGK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	48	5	2	P04797; E9PTN6	M19(Oxidation)	5,83	3	3324,77	0
28	M	WGDAGAEYVVESTGVFTTmEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	107	4	2	P04797; M0RA22	M19(Oxidation)	5,69	3	2293,41	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
28	M	IVSNAScTTNcLAPLAK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	204	15	3	P04797; E9PTN6; M0R660	C7(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl)	5,32	3	1819,25	0
28	M	VDIVAINDPFIDLNYmVYmFQYDSTHGK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	7	5	2	P04797; E9PTN6	M16(Oxidation); M19(Oxidation)	5,16	3	3341,30	0
28	M	VIHDNFGIVEGLmTTVHAITATQK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	7	6	2	P04797; M0R660	M13(Oxidation)	5,11	3	2611,64	0
28	M	DPANIKWGDAGAEYVVESTGVFTTMEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	1	4	2	P04797; M0RA22		4,75	3	2915,94	1
28	M	RVIISAPSADAPmFVmGVNHEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	1	7	2	P04797; M0R660	M13(Oxidation); M16(Oxidation)	3,66	3	2401,43	1
28	M	LVINGKPITIFQER	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	84	14	1	P04797		3,40	3	1630,92	0
28	M	RVIISAPSADAPmFVmGVNHEK	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 - [G3P_RAT]	1	7	2	P04797; M0R660	M16(Oxidation)	3,17	3	2386,53	1
29	M	LPADTEVVcAPPTAYIDFAR	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	18	1	1	P48500	C9(Carbamidomethyl)	6,00	2	2206,58	0
29	M	RHIFGESDELIGQK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	26	2	1	P48500		5,71	3	1631,54	1
29	M	VTNGAFTGEISPGMIK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	154	2	1	P48500		5,63	2	1621,85	0
29	M	VTNGAFTGEISPGmIK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	121	2	1	P48500	M14(Oxidation)	5,42	2	1638,38	0
29	M	DLGATWVVLGHSER	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	15	2	1	P48500		5,30	2	1540,18	0
29	M	HIFGESDELIGQK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	220	2	1	P48500		5,14	2	1473,14	0
29	M	cNVSEGVAQcTR	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	82	2	1	P48500	C1(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	4,98	2	1381,94	0
29	M	IYGGSVTGATcK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	106	3	1	P48500	C12(Carbamidomethyl)	4,97	2	1327,13	0
29	M	VVLAYEPVWAIGTGK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	41	2	1	P48500		4,96	2	1605,26	0
29	M	cLGELicTLNAAK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	10	2	1	P48500	C1(Carbamidomethyl); C7(Carbamidomethyl)	4,71	2	1463,44	0

Spot N°	T	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
29	M	VNHALSEGLGVIAcIGEK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	5	3	1	P48500	C14(Carbamidomethyl)	4,63	3	1867,48	0
29	M	IAVAAQNcYK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	85	2	1	P48500	C8(Carbamidomethyl)	4,12	2	1138,09	0
29	M	TATPQQAQEVHEK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	57	2	1	P48500		3,88	2	1467,17	0
30	M	LPADTEVVcAPPTAYIDFAR	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	30	1	1	P48500	C9(Carbamidomethyl)	5,82	2	2206,74	0
30	M	DLGATWVVLGHSEK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	17	2	1	P48500		5,35	2	1541,39	0
30	M	HIFGESDELIGQK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	136	2	1	P48500		4,98	2	1472,84	0
30	M	IYGGSVTGATcK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	91	3	1	P48500	C12(Carbamidomethyl)	4,92	2	1328,03	0
30	M	VTNGAFTGEISPGmIK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	64	2	1	P48500	M14(Oxidation)	4,89	2	1639,27	0
30	M	VVLAYEPVWAIGTGK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	93	2	1	P48500		4,88	2	1605,19	0
30	M	VTNGAFTGEISPGMIK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	9	2	1	P48500		4,69	2	1622,82	0
30	M	cLGELcTLNAAK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	15	2	1	P48500	C1(Carbamidomethyl); C7(Carbamidomethyl)	4,58	2	1464,00	0
30	M	cNVSEGVAQcTR	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	54	2	1	P48500	C1(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	4,35	2	1381,10	0
30	M	RHIFGESDELIGQK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	3	2	1	P48500		4,01	2	1629,44	1
30	M	IAVAAQNcYK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	63	2	1	P48500	C8(Carbamidomethyl)	3,96	2	1137,44	0
30	M	TATPQQAQEVHEK	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2 - [TPIS_RAT]	44	2	1	P48500		3,80	2	1467,16	0

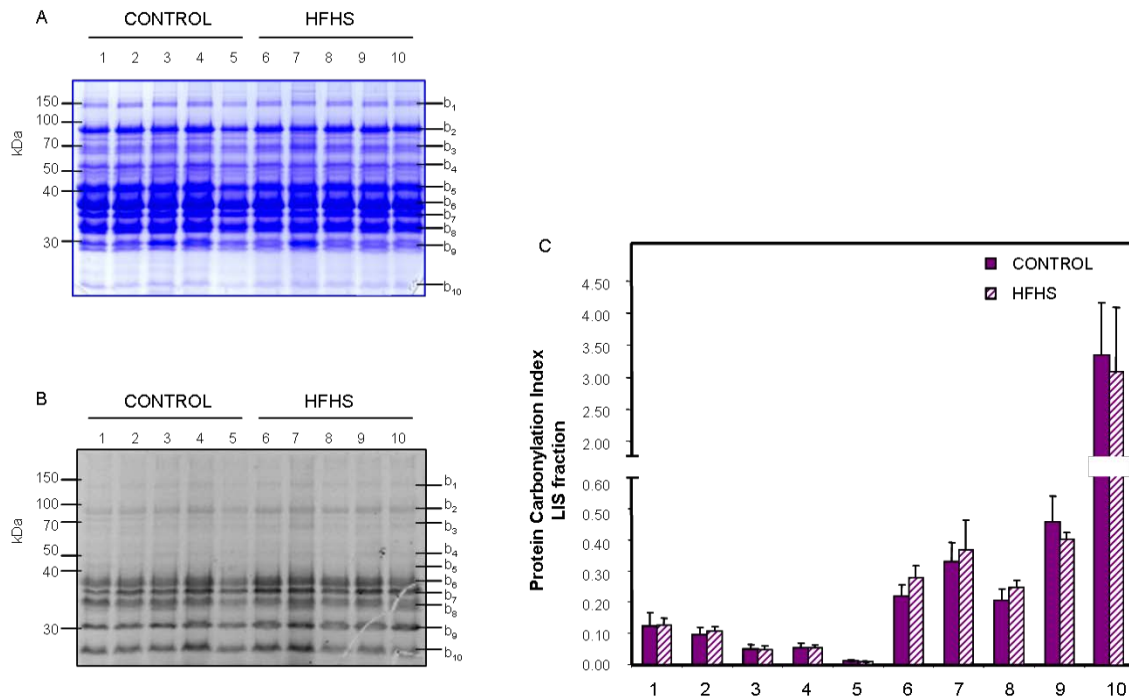


ANEXO 2:

Material suplementario del Capítulo 3 de la sección IV RESULTADOS

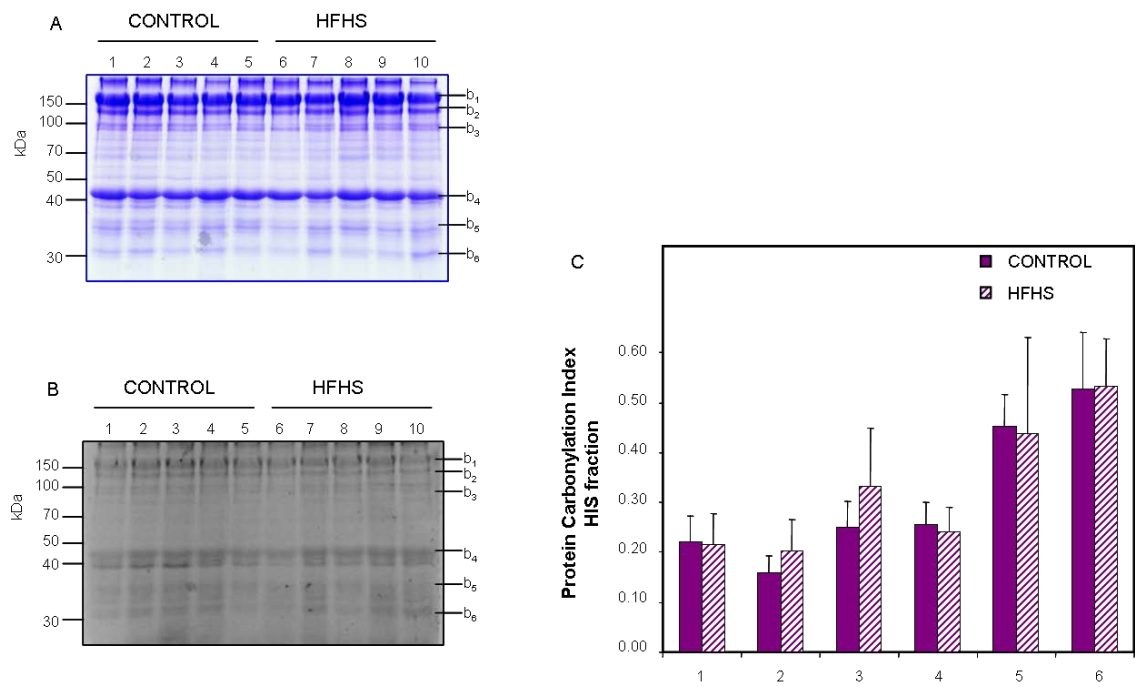
Supplementary Fig. S1.

Effect of HFHS diet on carbonylation level of LIS skeletal muscle proteins from male Sprague–Dawley rats. (A) 1-D Coomassie-stained gel of LIS proteins from control and HFHS dietary groups. Lanes 1, 2, 3, 4 and 5: control diet. Lanes 6, 7, 8, 9 and 10: HFHS diet. (B) 1-D FTSC-stained gel of LIS proteins from control and HFHS dietary groups. Lanes 1, 2, 3, 4 and 5: control diet. Lanes 6, 7, 8, 9 and 10: HFHS diet. (C) Protein carbonylation indexes of specific LIS protein bands (b1 to b10) for control and HFHS dietary groups. Data are presented as mean \pm S.D. * $P < .05$.



Supplementary Fig. S2.

Effect of HFHS diet on carbonylation level of HIS skeletal muscle proteins from male Sprague–Dawley rats. (A) 1-D Coomassie-stained gel of HIS proteins from control and HFHS dietary groups. Lanes 1, 2, 3, 4 and 5: control diet. Lanes 6, 7, 8, 9 and 10: HFHS diet. (B) 1-D FTSC-stained gel of HIS proteins from control and HFHS dietary groups. Lanes 1, 2, 3, 4 and 5: control diet. Lanes 6, 7, 8, 9 and 10: HFHS diet. (C) Protein carbonylation indexes of specific HIS protein bands (b1 to b6) for control and HFHS dietary groups. Data are presented as mean \pm S.D. * P <.05.



Supplementary Table S1. Protein identification data.

The table lists all protein spots and identification data obtained when tandem MS data of the two liver protein fraction studied, LIS=low-ionic strength protein fraction and HIS=high-ionic strength protein fraction., were searched against the UniprotKB database for taxonomy *Rattus*.

UniprotKB Code, Gene Name and Protein description are from UniprotKB rat database.

Protein score is the protein identification score obtained from the Sequest HT searches. # PSMs are the number of true positive peptide spectrum matches found for the protein.

Coverage value indicates the percentage of the protein's amino acid sequence identified from the MS data according to Sequest HT. # peptides is the number of peptides identified with FDR<0.01. Peptide list for the identified proteins are showed in supplemental Table S2.

Spot N°	Liver	Uniprot KB Code	Gen Name	Description	Celullar component	Sequest HT Score	PSMs	Peptides	Coverage (%)	AAs	Mw (kDA)	pI
1	LIS	P07756	Cps1	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	Mitochondrion	5760,49	1294	44	46,53	1500	164,5	6,8
2	LIS	P02770	Alb	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	Cytoplasm	367,53	101	13	30,92	608	68,7	6,5
3	LIS	Q4KLZ6	Dak	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) OS=Rattus norvegicus GN=Dak PE=1 SV=1 - [DHAK_RAT]	Cytoplasm	32,90	10	5	9,86	578	59,4	7,5
3	LIS	P04762	Cat	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	Peroxisome	22,10	2	2	5,69	527	59,7	7,5
4	LIS	P11884	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	Mitochondrion	1981,67	534	16	41,04	519	56,5	7,0
5	LIS	P09034	Ass1	Argininosuccinate synthase OS=Rattus norvegicus GN=Ass1 PE=2 SV=1 - [ASSY_RAT]	Cytoplasm, outer mitochondrial membrane	118,90	37	5	13,59	412	46,5	7,8
6	LIS	Q03336	Rgn	Regucalcin OS=Rattus norvegicus GN=Rgn PE=1 SV=3 - [RGN_RAT]	Cytoplasm	146,71	37	5	24,75	299	33,4	5,5
7	LIS	P00507	Got2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	Mitochondrion	1219,76	309	10	32,33	430	47,3	9,0
8	HIS	G3V6D3	Atp5b	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	Mitochondrion	4210,07	1092	23	69,19	529	56,3	5,3
9	HIS	P60711	Actb	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	Cytoplasm	130,79	44	8	42,93	375	41,7	5,5
10	HIS	P11884	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	Mitochondrion	219,16	71	15	49,71	519	56,5	7,3
10	HIS	Q9JLJ3	Aldh9a1	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Aldh9a1 PE=1 SV=1 - [AL9A1_RAT]	Cytoplasm	21,50	8	3	7,89	494	53,6	6,9
11	HIS	P10860	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	Mitochondrion	2544,66	619	16	42,11	558	61,4	8,0

Supplementary Table S2. Peptide list for identified protein in liver.

The table lists all peptide sequences and amino acid modifications found for identified proteins of the two liver protein fraction studied, LIS=low-ionic strenght protein fraction and HIS=high-ionic strenght protein fraction.

XCorr value is the score of the cross-correlation of the each peptide match with the theoretical spectrum from the Sequest HT searches.# PSMs are the number of true positive peptide spectrum matches found for the sequence.

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
1	LIS	VISHAISEHVEDAGVHSGDATLMLPTQTISQGAIEK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	3	1	1	P07756		8,5	3	3742,8	0
1	LIS	AERPDGLILGMGGQTALNcGVE LFK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	30	1	1	P07756	C19(Carbamidomethyl)	7,3	3	2647,0	0
1	LIS	QIDTLAAEYPSVTNYLYVTYNG QEHDIK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	14	1	1	P07756		6,9	3	3246,0	0
1	LIS	GQILTmANPIIGNGGAPDTTARD ELGLNK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	10	1	1	P07756	M6(Oxidation)	6,6	3	2953,9	1
1	LIS	GQILTMANPIIGNGGAPDTTAR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	43	1	1	P07756		6,6	3	2168,9	0
1	LIS	AERPDGLILGmGGQTALNcGVE LFK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	30	1	1	P07756	M11(Oxidation); C19(Carbamidomethyl)	6,5	3	2663,0	0
1	LIS	TVVVNcNPETVSTDFEcDKLYF EELSLEK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	27	1	1	P07756	C6(Carbamidomethyl); C18(Carbamidomethyl)	6,3	3	3609,0	1
1	LIS	cEmASTGEVAcFGEGIHATAFLK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	18	1	1	P07756	C1(Carbamidomethyl); M3(Oxidation); C11(Carbamidomethyl)	6,2	3	2431,7	0
1	LIS	VLILSGGLSIGQAGEFDYSGSQ AVK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	130	1	1	P07756		6,2	3	2553,8	0
1	LIS	GYSFGHPSSVAGEVVFNLTGLG YSEALTDPAYK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	25	1	1	P07756		6,2	3	3378,1	0
1	LIS	AERpDGLILGMGGQTALNcGVE LFK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	26	1	1	P07756	P4(Glutamic semialdehyde (P)); C19(Carbamidomethyl)	6,1	3	2662,9	0
1	LIS	cEMASTGEVAcFGEGIHATAFLK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	10	1	1	P07756	C1(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl)	6,1	3	2415,6	0
1	LIS	DADDNcVTcNMENV DAMGVH TGDVSVVAPAQTLSNAEFQMLR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	3	1	1	P07756	C6(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	6,0	3	4682,1	0

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
1	LIS	TVLMNPNIASVQTNEVGLK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	54	1	1	P07756		5,9	3	2028,6	0
1	LIS	GQILTMANpIIGNGGAPDTTARD ELGLNK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	6	1	1	P07756	P9(Glutamic semialdehyde (P))	5,8	3	2953,9	1
1	LIS	TVLMNPNIASVQTNEVGLK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	20	1	1	P07756	M4(Oxidation)	5,7	3	2044,0	0
1	LIS	ILDYHQAeNGcIISVGGQIPNNL AVPLYK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	23	1	1	P07756	C10(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)	5,7	3	3470,9	0
1	LIS	GQILTMANpIIGNGGAPDTTAR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	22	1	1	P07756	M6(Oxidation)	5,7	3	2184,6	0
1	LIS	IEFEGQSVDFVDPNKQNLIAEVS TK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	61	1	1	P07756		5,5	3	2807,8	1
1	LIS	ILESDRKEPLFGISTGNIITGLAAG AK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	2	1	1	P07756		5,5	3	2772,4	2
1	LIS	TVLMNPNIASVQTNEVGLK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	19	1	1	P07756	P6(Glutamic semialdehyde (P))	5,5	3	2044,0	0
1	LIS	KEPLFGISTGNIITGLAAGAK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	23	1	1	P07756		5,3	3	2060,4	1
1	LIS	TAVDSGIALLTNFQVTK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	94	1	1	P07756		5,3	3	1780,2	0
1	LIS	GQILTMANpIIGNGGAPDTTARD ELGLNK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	10	1	1	P07756		5,2	3	2938,1	1
1	LIS	HLPTLEQPIIPSDYVAIK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	74	1	1	P07756		5,1	3	2034,6	0
1	LIS	DADDNcVTVCnmENVDAmgVH TGDSVVVAPAQTLSNAEFQMLR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	4	1	1	P07756	C6(Carbamidomethyl); N11(Schiff base adduct with Acetaldehyde); M12(Oxidation); M18(Oxidation)	4,9	3	4683,3	0
1	LIS	DADDNcVTVCnmENVDAmgVH TGDSVVVAPAQTLSNAEFQMLR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	1	1	1	P07756	C10(Michael-type adduct with 2-Hexenal); M12(Oxidation)	4,9	3	4682,1	0
1	LIS	RTAVDSGIALLTNFQVTK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	4	1	1	P07756		4,8	3	1934,5	1
1	LIS	SAYALGGLGSGlcPNKETLmDLG TK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	2	1	1	P07756	C13(Carbamidomethyl); M20(Oxidation)	4,8	3	2569,8	1
1	LIS	AFAISGPFNVQFLVK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	38	1	1	P07756		4,8	3	1640,4	0

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
1	LIS	IEFEGQSVDFVDPNK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	18	1	1	P07756		4,8	2	1723,8	0
1	LIS	DGSIDLVINLPNNNTK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	39	1	1	P07756		4,8	2	1728,2	0
1	LIS	TVVVNcNPETVSTDFDeDK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	6	1	1	P07756	C6(Carbamidomethyl); C18(Carbamidomethyl)	4,7	2	2329,0	0
1	LIS	GQILTMANpIIGNGGAPDPTAR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	22	1	1	P07756	P9(Glutamic semialdehyde (P))	4,7	3	2185,1	0
1	LIS	SAYALGGLGSGIcPNKETLMDLG TK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	4	1	1	P07756	C13(Carbamidomethyl)	4,7	3	2553,9	1
1	LIS	McHPSVDGFTPR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	12	1	1	P07756	C2(Carbamidomethyl)	4,6	3	1403,2	0
1	LIS	EPLFGISTGNIITGLAAGAK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	56	1	1	P07756		4,6	2	1932,0	0
1	LIS	TSAcFEPSLDYMVTK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	19	1	1	P07756	C4(Carbamidomethyl)	4,6	3	1749,2	0
1	LIS	SAYALGGLGSGIcPNK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	15	1	1	P07756	C13(Carbamidomethyl)	4,6	2	1564,8	0
1	LIS	QADAVYFLPITPQFVTEVIK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	3	1	1	P07756		4,6	3	2282,2	0
1	LIS	TVVVNcNPETVSTDFDEC DKLYF EELSLe	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	1	1	1	P07756	C6(Carbamidomethyl); R30(Glutamic semialdehyde (R))	4,5	3	3611,6	1
1	LIS	FLGVAEQLHNEGFK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	16	1	1	P07756		4,4	2	1590,8	0
1	LIS	GLNSESVTEETLR	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	35	1	1	P07756		4,3	2	1436,6	0
1	LIS	IAPSFVESMEDALK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	36	1	1	P07756		4,1	2	1608,0	0
1	LIS	TSAcFEPSLDYmVTK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	19	1	1	P07756	C4(Carbamidomethyl); M12(Oxidation)	4,1	2	1764,9	0
1	LIS	SAYALGGLGSGIcpNK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	6	1	1	P07756	C13(Carbamidomethyl); P14(Glutamic semialdehyde (P))	4,0	2	1581,8	0
1	LIS	ALENNMSLDEIVK	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cps1 PE=1 SV=1 - [CPSM_RAT]	32	1	1	P07756		3,9	2	1475,9	0

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
2	LIS	ccAEGDPPAcYGTVLAEFQPLVEE PK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	13	1	1	P02770	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	5,6	2	2937,4	0
2	LIS	AADKDNcFATEGPNLVAR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	20	1	1	P02770	C7(Carbamidomethyl)	4,8	2	1949,7	1
2	LIS	YNEVLQccTESDK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	3	1	1	P02770	C8(Carbamidomethyl); C9(Carbamidomethyl)	4,2	2	1746,6	0
2	LIS	AETFTFHSDIcTLPDKEK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	1	1	1	P02770	C11(Carbamidomethyl)	4,1	2	2138,9	1
2	LIS	RPcFSALTVDETYVPK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	10	1	1	P02770	C3(Carbamidomethyl)	4,0	2	1883,0	0
2	LIS	LPcVEDYLSAILNR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	18	1	1	P02770	C3(Carbamidomethyl)	3,8	2	1662,3	0
2	LIS	FPNAEFAEITK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	18	1	1	P02770		3,8	2	1266,7	0
2	LIS	LQAccDKPVLQK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	5	1	1	P02770	C4(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl)	3,6	2	1459,7	0
2	LIS	rpCFsALTVDETYVPK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	7	1	1	P02770		3,6	2	1882,2	0
2	LIS	TVMGDFAQFVDK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	3	1	1	P02770		3,5	2	1358,8	0
2	LIS	KQTALAEIVK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	5	1	1	P02770		3,4	2	1100,8	1
2	LIS	APQVSTPTLVEAAR	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	1	1	1	P02770		3,2	2	1439,3	0
2	LIS	LVQEVTDFAK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	2	1	1	P02770		3,1	2	1149,6	0
2	LIS	GLVLIAFSQYLQK	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	2	1	1	P02770		3,0	2	1479,9	0
3	LIS	AILEVLQTK	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) OS=Rattus norvegicus GN=Dak PE=1 SV=1 - [DHAK_RAT]	3	1	1	Q4KLZ6		2,2	2	1015,7	0
3	LIS	AVAQAGTAGTLLIVK	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) OS=Rattus norvegicus GN=Dak PE=1 SV=1 - [DHAK_RAT]	1	1	1	Q4KLZ6		2,0	2	1413,7	0
3	LIS	ALVGTFmSALEmR	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) OS=Rattus norvegicus GN=Dak PE=1 SV=1 - [DHAK_RAT]	2	1	1	Q4KLZ6	M7(Oxidation); M12(Oxidation)	1,9	2	1458,6	0

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
3	LIS	LSVLLLEK	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) OS=Rattus norvegicus GN=Dak PE=1 SV=1 - [DHAK_RAT]	3	1	1	Q4KLZ6		1,8	2	915,3	0
3	LIS	SPGASLLPVLTK	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) OS=Rattus norvegicus GN=Dak PE=1 SV=1 - [DHAK_RAT]	1	1	1	Q4KLZ6		1,7	3	1183,0	0
3	LIS	APQKPDVLTGGGNPIGDK	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	1	1	1	P04762		2,4	3	1866,0	0
3	LIS	LAQEDPDYGLR	Catalase OS=Rattus norvegicus GN=Cat PE=1 SV=3 - [CATA_RAT]	1	1	1	P04762		1,6	2	1277,5	0
4	LIS	VAFTGSTEVGHLIQVAAGSSNLK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	60	2	1	P11884		5,8	2	2286,4	0
4	LIS	EAGFPFGVVNIVPGFGPTAGAAIA SHEDVDK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	50	2	1	P11884		5,1	3	3020,0	0
4	LIS	VAEQTPLTALYVANLIK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	57	2	1	P11884		4,6	2	1846,3	0
4	LIS	VAFTGSTEVGHLIQVAAGSSNLK R	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	3	2	1	P11884		4,5	2	2442,7	1
4	LIS	LGPALATGNVVVmK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	52	2	1	P11884	M13(Oxidation)	4,5	2	1387,0	0
4	LIS	KTFPTVNPSTGEVlcQVAEGNK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	8	2	1	P11884	C15(Carbamidomethyl)	4,4	3	2376,3	1
4	LIS	AAQAAFQLGSpWR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	3	1	1	P11884	P11(5-Oxoproline)	4,3	2	1416,5	0
4	LIS	LGPALATGNVVVMK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	34	2	1	P11884		4,3	3	1373,0	0
4	LIS	TFVQEDVYDEFVER	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	30	2	1	P11884		4,2	3	1774,9	0
4	LIS	ELGEYGLQAYTEVK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	52	2	1	P11884		4,1	2	1599,7	0
4	LIS	TFPTVNPSTGEVlcQVAEGNKEDV DK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	3	2	1	P11884	C14(Carbamidomethyl)	4,0	2	2834,1	1
4	LIS	AAQAAFQLGSpWR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	3	1	1	P11884	P11(Glutamic semialdehyde (P))	4,0	2	1419,6	0
4	LIS	AAQAAFQLGSPWR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	26	1	1	P11884		3,9	2	1404,5	0
4	LIS	TFPTVNPSTGEVlcQVAEGNK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	11	2	1	P11884	C14(Carbamidomethyl)	3,9	2	2248,0	0
4	LIS	AAQAAFQLGSpWR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	3	1	1	P11884	S10(3-Oxoxalanine (S)); P11(Glutamic semialdehyde (P))	3,9	2	1416,5	0

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
4	LIS	EEIFGPMQILK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	48	2	1	P11884		3,9	2	1403,4	0
4	LIS	TEQGPQVDETQFK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	18	2	1	P11884		3,8	3	1506,6	0
4	LIS	AAQAAFQLGSPwR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	8	1	1	P11884	W12(N-formylkynurenine)	3,8	2	1435,8	0
4	LIS	EEIFGPMQILK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	30	2	1	P11884	M8(Oxidation)	3,5	3	1419,8	0
4	LIS	GYFIQPTVFGDVK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	37	2	1	P11884		3,3	3	1470,9	0
4	LIS	YGLAAAVFTK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	2	2	1	P11884		2,9	3	1040,7	0
4	LIS	LLcGGGAAADR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1 - [ALDH2_RAT]	1	2	1	P11884	C3(Carbamidomethyl)	2,8	3	1060,4	0
5	LIS	FELTcYSLAPQIK	Argininosuccinate synthase OS=Rattus norvegicus GN=Ass1 PE=2 SV=1 - [ASSY_RAT]	16	1	1	P09034	C5(Carbamidomethyl)	4,2	3	1569,7	0
5	LIS	DGTTHSTSLDLmYLNEVAGK	Argininosuccinate synthase OS=Rattus norvegicus GN=Ass1 PE=2 SV=1 - [ASSY_RAT]	1	1	1	P09034	M13(Oxidation)	3,8	3	2316,3	0
5	LIS	APNTPDVLEIEFK	Argininosuccinate synthase OS=Rattus norvegicus GN=Ass1 PE=2 SV=1 - [ASSY_RAT]	15	1	1	P09034		3,5	3	1472,6	0
5	LIS	APNTPDVLEIEFKK	Argininosuccinate synthase OS=Rattus norvegicus GN=Ass1 PE=2 SV=1 - [ASSY_RAT]	2	1	1	P09034		3,2	3	1600,6	1
5	LIS	NDLmEYAK	Argininosuccinate synthase OS=Rattus norvegicus GN=Ass1 PE=2 SV=1 - [ASSY_RAT]	3	1	1	P09034	M4(Oxidation)	2,6	3	1000,5	0
6	LIS	YFDQVDISNGLDWSLDHK	Regucalcin OS=Rattus norvegicus GN=Rgn PE=1 SV=3 - [RGN_RAT]	7	1	1	Q03336		5,3	2	2152,3	0
6	LIS	YFAGTmAETAPAVLER	Regucalcin OS=Rattus norvegicus GN=Rgn PE=1 SV=3 - [RGN_RAT]	10	1	1	Q03336	M6(Oxidation)	5,2	2	1871,9	0
6	LIS	HQGSLSLFPDHSV K	Regucalcin OS=Rattus norvegicus GN=Rgn PE=1 SV=3 - [RGN_RAT]	15	1	1	Q03336		4,3	3	1718,1	0
6	LIS	DYSEmYVTcAR	Regucalcin OS=Rattus norvegicus GN=Rgn PE=1 SV=3 - [RGN_RAT]	2	1	1	Q03336	M5(Oxidation); C9(Carbamidomethyl)	3,1	2	1410,5	0
6	LIS	YFAGTMAEETApAVLER	Regucalcin OS=Rattus norvegicus GN=Rgn PE=1 SV=3 - [RGN_RAT]	2	1	1	Q03336	P12(Glutamic semialdehyde (P))	2,9	2	1871,8	0
6	LIS	VGVDAPVSSVALR	Regucalcin OS=Rattus norvegicus GN=Rgn PE=1 SV=3 - [RGN_RAT]	1	1	1	Q03336		2,8	3	1269,7	0
7	LIS	HFIEQGGINvLcQSYAK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	37	1	1	P00507	C10(Carbamidomethyl); C12(Carbamidomethyl)	6,1	3	2066,7	0
7	LIS	NLDKEYLPIGGLADFcK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	33	1	1	P00507	C16(Carbamidomethyl)	5,4	2	1953,2	1

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
7	LIS	NLDKEYLpIGGLADFcK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	7	1	1	P00507	P8(Glutamic semialdehyde (P)); C16(Carbamidomethyl)	4,8	2	1970,0	1
7	LIS	TcGFDFSGALEDISK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	43	2	1	P00507	C2(Carbamidomethyl)	4,6	2	1646,9	0
7	LIS	ASAEALGENSEVLK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	76	1	1	P00507		4,6	2	1530,9	0
7	LIS	ISVAGVTSGNVGYLAHAIHQVTK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	6	1	1	P00507		4,5	2	2322,1	0
7	LIS	NLDKEYLPIGGLADFCk	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	1	1	1	P00507	K17(Michael-type adduct with Acrolein)	4,3	2	1953,2	1
7	LIS	NLDKEYLpIGGLADFcK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	2	1	1	P00507	P8(5-Oxoproline); C16(Carbamidomethyl)	4,1	2	1967,0	1
7	LIS	FVTVTQISGTGALR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	49	1	1	P00507		4,1	3	1451,7	0
7	LIS	ILIRPLYSNPPLNGAR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	1	1	1	P00507		4,1	2	1795,9	0
7	LIS	DAGMQLQGYR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	24	3	1	P00507		3,9	3	1140,6	0
7	LIS	DAGmQLQGYR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	4	3	1	P00507	M4(Oxidation)	3,7	2	1154,6	0
7	LIS	TCGFDFSGALEDISK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	1	2	1	P00507		3,6	3	1589,9	0
7	LIS	IAATILTSPDLR	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	30	2	1	P00507		3,5	2	1272,6	0
7	LIS	EYLPiGGLADFcK	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Got2 PE=1 SV=2 - [AATM_RAT]	4	1	1	P00507	C12(Carbamidomethyl)	3,5	3	1484,2	0
8	HIS	GFQQILAGDYDHLPEQAFYmVGP IEEAVAK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	22	2	1	G3V6D3	M20(Oxidation)	7,8	2	3352,6	0
8	HIS	KGSITSVQAIYVPADDLTDPAPAT TFAHLDATTVLSR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	5	2	1	G3V6D3		7,4	2	3843,6	1
8	HIS	GFQQILAGDYDHLPEQAFYmVGP IEEAVAK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	11	2	1	G3V6D3		6,9	2	3336,8	0
8	HIS	QFAPIHAEAPEFIEmSVEQEILVTG IK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	10	2	1	G3V6D3	M15(Oxidation)	6,1	3	3042,7	0
8	HIS	IPSAVGyQPTLATDmGTmQER	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	42	2	1	G3V6D3	M15(Oxidation); M18(Oxidation)	5,9	3	2298,3	0
8	HIS	QFAPIHAEAPEFIEmSVEQEILVTG IK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	8	2	1	G3V6D3		5,8	3	3026,7	0

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
8	HIS	GSITSVQAIYVPADDLTPAPATT FAHLDTATVLSR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	31	2	1	G3V6D3		5,7	2	3715,1	0
8	HIS	IPSAVGYPQLATDMGTMQER	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	69	2	1	G3V6D3		5,7	3	2268,2	0
8	HIS	AIAELGIYPAVDPLDSTR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	124	2	1	G3V6D3		5,2	2	1990,9	0
8	HIS	TREGNDLYHEMIESGVINLK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	9	2	1	G3V6D3		5,0	3	2318,1	1
8	HIS	EGNDLYHEMIESGVINLK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	20	2	1	G3V6D3		4,9	3	2061,0	0
8	HIS	IMDPNIVGSEHYDVAR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	18	2	1	G3V6D3		4,8	2	1817,7	0
8	HIS	SLQDIIAILGmDELSEEDKLTVSR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	3	2	1	G3V6D3	M11(Oxidation)	4,7	3	2691,5	1
8	HIS	VLDSGAPIKIPVGPETLGR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	55	2	1	G3V6D3		4,6	2	1919,5	1
8	HIS	VALTGLTVAEYFR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	96	2	1	G3V6D3		4,6	2	1442,2	0
8	HIS	FTQAGSEVSALLGR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	96	2	1	G3V6D3		4,4	2	1435,8	0
8	HIS	DQEGQDVLLFIDNIFR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	5	2	1	G3V6D3		4,4	2	1922,8	0
8	HIS	IPSAVGYPQLATDMGTMQER	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	118	2	1	G3V6D3	M18(Oxidation)	4,4	2	2282,4	0
8	HIS	VALVYGMNEPPGAR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	57	2	1	G3V6D3		4,4	3	1602,1	0
8	HIS	ImDPNIVGSEHYDVAR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	6	2	1	G3V6D3	M2(Oxidation)	4,4	3	1831,8	0
8	HIS	TREGNDLYHEmIESGVINLK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	1	2	1	G3V6D3	M11(Oxidation)	4,3	3	2334,3	1
8	HIS	TVLIMELINNVAK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	22	2	1	G3V6D3		4,3	3	1457,8	0
8	HIS	IPSAVGYPQLATDMGTMQER	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	1	2	1	G3V6D3	P9(5-Oxoproline)	4,3	3	2279,3	0
8	HIS	GFQQLAGDYDHLpEQAfYmVGpI EEAVAK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	2	2	1	G3V6D3	P14(5-Oxoproline); M20(Oxidation); P23(5- Oxoproline)	4,3	3	3381,1	0
8	HIS	SLQDIIAILGmDELSEEDKLTVSR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	2	2	1	G3V6D3		4,3	3	2675,5	1
8	HIS	EGNDLYHEmIESGVINLK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	4	2	1	G3V6D3	M9(Oxidation)	4,3	3	2076,9	0
8	HIS	VLDSGApIKIPVGPETLGR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	1	2	1	G3V6D3	P7(5-Oxoproline)	4,2	3	1934,4	1

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
8	HIS	FLSQPFQVAEVFTGHMGK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	11	2	1	G3V6D3		4,2	3	2023,0	0
8	HIS	VALVYGQmNEPPGAR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	32	2	1	G3V6D3	M8(Oxidation)	4,1	2	1618,0	0
8	HIS	AHGGYSVFAGVGER	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	31	2	1	G3V6D3		4,1	2	1407,8	0
8	HIS	ImNVIGEPIDER	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	54	2	1	G3V6D3	M2(Oxidation)	3,9	3	1401,7	0
8	HIS	IMNVIGEPIDER	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	25	2	1	G3V6D3		3,8	3	1385,7	0
8	HIS	LVLEVAQHLGESTVR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	38	2	1	G3V6D3		3,8	3	1650,9	0
8	HIS	TVLIImELINNVAK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	32	2	1	G3V6D3	M5(Oxidation)	3,7	2	1474,0	0
8	HIS	FLSQPFQVAEVFTGHmGK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	6	2	1	G3V6D3	M16(Oxidation)	3,7	2	2038,9	0
8	HIS	AIAELGIYpAVDpLDSTSR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	1	2	1	G3V6D3	P9(5-Oxoproline); P13(5-Oxoproline)	3,2	3	2016,1	0
8	HIS	AIAELGIYpAVDPLDSTSR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	5	2	1	G3V6D3	P9(5-Oxoproline)	3,2	3	2002,0	0
8	HIS	IGLFGGAGVGK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	12	2	1	G3V6D3		3,1	2	977,4	0
8	HIS	VLDSGAPIK	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	5	2	1	G3V6D3		3,1	3	901,4	0
8	HIS	TIAMDGTGLVR	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=3 SV=1 - [G3V6D3_RAT]	2	2	1	G3V6D3		3,0	3	1262,7	0
9	HIS	LcYVALDFEQEMATAASSSSLEK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	9	2	1	P60711	C2(Carbamidomethyl)	4,0	3	2549,3	0
9	HIS	YpIEHGIVTNWDDMEK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	3	2	1	P60711	P2(5-Oxoproline)	3,8	3	1961,8	0
9	HIS	cPEALFQPSFLGmESCGIhETTFNSImK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	3	2	1	P60711	C1(Carbamidomethyl); M13(Oxidation); H19(Schiff base adduct with Acetaldehyde); M27(Oxidation)	3,5	3	3233,2	0
9	HIS	cPEALFQPSFLGMEScGIHETTFNSIMK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	4	2	1	P60711	C1(Carbamidomethyl); C16(Carbamidomethyl)	3,4	2	3232,7	0
9	HIS	YPIEHGIVTNWDDMEK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	3	2	1	P60711	H5(2-Oxohistidine)	3,4	3	1961,4	0

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
9	HIS	YPIEHGIVTNWDDmEK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	1	2	1	P60711	H5(2-Oxohistidine); M14(Oxidation)	3,3	3	1978,4	0
9	HIS	SYELPDGQVITIGNER	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	7	8	2	P63269;P60711		3,2	3	1792,7	0
9	HIS	YpIEHGIVTNWDDmEK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	1	2	1	P60711	P2(5-Oxoproline); M14(Oxidation)	3,1	2	1978,4	0
9	HIS	MTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLS LYASGR	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	3	2	1	P60711		3,1	2	3256,2	0
9	HIS	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	5	3	1	P60711		3,0	2	2216,3	0
9	HIS	cPEALFQPSFLGmEScGIHETTFNSI MK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	2	2	1	P60711	C1(Carbamidomethyl); M13(Oxidation); C16(Carbamidomethyl)	2,9	2	3248,1	0
9	HIS	GSYFTTTAER	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	6	2	1	P60711		2,8	2	1132,7	0
9	HIS	LcYVALDFEQEmATAASSSSLEK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	3	2	1	P60711	C2(Carbamidomethyl); M12(Oxidation)	2,8	2	2567,6	0
9	HIS	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_RAT]	1	2	1	P60711		2,6	2	1954,5	0
10	HIS	TFVQEDVYDEFVER	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [F1LN88_RAT]	6	2	1	F1LN88		5,1	2	1778,2	0
10	HIS	VAEQTPLTALYVANLIK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [F1LN88_RAT]	9	2	1	F1LN88		4,4	2	1846,4	0
10	HIS	TYLAALETLDNGKPYVISYLVLDL DMVLK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [F1LN88_RAT]	8	2	1	F1LN88		4,0	2	3161,1	0
10	HIS	TEQGPQVDETQFK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [F1LN88_RAT]	6	2	1	F1LN88		3,5	2	1507,6	0
10	HIS	HEPVGVCgQIIPWNFPLMQAWK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [F1LN88_RAT]	2	2	1	F1LN88	C7(Carbamidomethyl)	3,3	2	2721,7	0
10	HIS	EEIFGPVMQILK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [F1LN88_RAT]	6	2	1	F1LN88		3,2	3	1404,7	0
10	HIS	ELGEYGLQAYTEVK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [F1LN88_RAT]	3	2	1	F1LN88		3,2	3	1600,4	0
10	HIS	LLcGGGAAADR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [F1LN88_RAT]	3	2	1	F1LN88	C3(Carbamidomethyl)	3,1	3	1060,7	0
10	HIS	LGPALATGNVVVmK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [F1LN88_RAT]	4	2	1	F1LN88	M13(Oxidation)	3,1	3	1386,7	0

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
10	HIS	ANYLSQALQAGTVwINcYDVFGA QSPFGGYK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [FILN88_RAT]	1	2	1	FILN88	W14(Kynurenine); C17(Carbamidomethyl)	3,1	3	3429,2	0
10	HIS	KTFPTVNPSTGEVcQVAEGNKED VDK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [FILN88_RAT]	1	2	1	FILN88	C15(Carbamidomethyl)	3,0	2	2963,7	2
10	HIS	VAFTGSTEVGHLIQVAAGSSNLK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [FILN88_RAT]	2	2	1	FILN88		3,0	3	2288,1	0
10	HIS	LGPALATGNVVVMK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [FILN88_RAT]	3	2	1	FILN88		2,9	3	1370,1	0
10	HIS	YGLAAAVFTK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [FILN88_RAT]	3	2	1	FILN88		2,9	2	1041,0	0
10	HIS	EEIFGPVmqILK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [FILN88_RAT]	3	2	1	FILN88	M8(Oxidation)	2,7	3	1420,6	0
10	HIS	TIEEVVGR	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [FILN88_RAT]	5	2	1	FILN88		2,6	2	902,8	0
10	HIS	GYFIQPTVFGDVK	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=4 SV=2 - [FILN88_RAT]	6	2	1	FILN88		2,6	3	1472,5	0
10	HIS	EQGATVLCGGEPYAPEDPK	4-trimethylaminobutylaldehyde dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Aldh9a1 PE=1 SV=1 - [AL9A1_RAT]	3	1	1	Q9JLJ3	C8(Carbamidomethyl)	2,9	2	2018,6	0
10	HIS	IGDPLEDTR	4-trimethylaminobutylaldehyde dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Aldh9a1 PE=1 SV=1 - [AL9A1_RAT]	3	1	1	Q9JLJ3		2,9	2	1130,5	0
10	HIS	VTIEYYSQLK	4-trimethylaminobutylaldehyde dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Aldh9a1 PE=1 SV=1 - [AL9A1_RAT]	2	1	1	Q9JLJ3		2,7	2	1244,7	0
11	HIS	cVGVGESDGSIWNPdGIDPK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	50	1	1	P10860	C1(Carbamidomethyl)	5,7	3	2102,0	0
11	HIS	VYEGSILEADcDILIPAASEK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	80	1	1	P10860	C11(Carbamidomethyl)	5,6	2	2294,0	0
11	HIS	DSNYHLLMSVQESLER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	57	1	1	P10860		5,0	3	1923,5	0
11	HIS	GVFHGIENFINEASYmSILGmTPGL GDK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	5	1	1	P10860	M16(Oxidation); M21(Oxidation)	4,8	2	3029,0	0
11	HIS	DSNYHLLmSVQESLER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	53	1	1	P10860	M8(Oxidation)	4,8	2	1937,9	0
11	HIS	IIAEGANGPTTPEADKIFLER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	74	1	1	P10860		4,8	2	2242,1	1
11	HIS	GFIGPGIDVPAPDMSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	64	1	1	P10860		4,7	2	1918,2	0
11	HIS	TFVVQGFgnVGLHSMR	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	30	1	1	P10860		4,7	3	1748,9	0
11	HIS	KGFIGPGIDVPAPDMSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	44	1	1	P10860		4,5	3	2045,2	1

Spot N°	Tissue fraction	Sequence	Description	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	# Missed Cleavages
11	HIS	cVGVGESDGSiWNPdGIDPK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	3	1	1	P10860	C1(Carbamidomethyl); W12(N-formylkynurenine)	4,5	3	2133,8	0
11	HIS	TFVVQGFGNVGLHSmR	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	27	1	1	P10860	M15(Oxidation)	4,5	2	1764,8	0
11	HIS	GFIGPGIDVPAPDmSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	34	1	1	P10860	M14(Oxidation)	4,4	2	1931,9	0
11	HIS	KGFIGPGIDVPAPDmSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	14	1	1	P10860	M15(Oxidation)	4,3	2	2060,3	1
11	HIS	IKPcNHVLSLSFPIR	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	8	1	1	P10860	C5(Carbamidomethyl)	4,3	2	1894,1	0
11	HIS	IIAEGANGPTTPEADK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	33	1	1	P10860		4,2	2	1583,7	0
11	HIS	GFIGPGIDVPApDMSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	27	1	1	P10860	P12(Glutamic semialdehyde (P))	4,0	2	1931,9	0
11	HIS	KGFIGPGIDVPApDMSTGER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	7	1	1	P10860	P13(Glutamic semialdehyde (P))	3,9	2	2060,3	1
11	HIS	cVGVGESDGSiWNPdGIDPK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	1	1	1	P10860	C1(Carbamidomethyl); W12(Kynurenine)	3,9	2	2105,1	0
11	HIS	DIVHSGLAYTMER	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	5	2	1	P10860		3,7	3	1492,0	0
11	HIS	GASIVEDKLVEDLK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	4	1	1	P10860		3,7	3	1517,3	1
11	HIS	cVGVGESDGSiWNPdGIDPK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	3	1	1	P10860	C1(Carbamidomethyl); P14(Glutamic semialdehyde (P))	3,7	3	2117,8	0
11	HIS	HGGTIPVVPTAEFQDR	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	16	1	1	P10860		3,4	3	1725,6	0
11	HIS	DDGSWEVIEGYR	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	10	1	1	P10860		3,4	3	1425,6	0
11	HIS	cAVVDVPFGGAK	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	4	1	1	P10860	C1(Carbamidomethyl)	3,2	3	1219,6	0
11	HIS	VYNEAGVTFT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Glud1 PE=1 SV=2 - [DHE3_RAT]	7	2	1	P10860		3,1	3	1100,5	0